

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 18 July 2000 (18.07.00)	
International application No. PCT/EP99/09781	Applicant's or agent's file reference 14692/PCT Ri
International filing date (day/month/year) 10 December 1999 (10.12.99)	Priority date (day/month/year) 14 December 1998 (14.12.98)
Applicant FUHR, Günter et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

31 May 2000 (31.05.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer S. Mafla
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

Verfahren und Vorrichtung zur zellspurbasierten
Zelluntersuchung und Zellkultivierung

Die Erfindung betrifft Verfahren und Vorrichtungen zur Zelluntersuchung, insbesondere Zellassays oder Zell-Testanordnungen, deren Herstellung und Verfahren zu deren Verwendung. Die Erfindung betrifft auch Verwendungen von Zellspuren auf Substratoberflächen.

In der Pharmakologie, Toxikologie und medizinischen Diagnostik nehmen zellbasierte Assays (Reaktionsansätze, Prüfansätze o. dgl.) eine Schlüsselstellung ein. Gesucht werden rasch handhabbare und hochspezifische Untersuchungs- und Nachweisverfahren für biologische Zellen an sich oder für deren Wechselwirkungen mit anderen Zellen oder mit natürlichen oder synthetischen Fremdstoffen. Darüber hinaus wäre es wünschenswert, wenn die zum Nachweis einer Substanz, eines Zelltyps, einer Medikamentenwirkung etc. benutzten Zellen wiederverwendbar (d.h. weiter kultivierbar) wären. Im medizinischen Bereich bedeutet das z.B. eine Rückführung in den Organismus des Spenders (z. B. eines Patienten) oder eines anderen menschlichen Empfängers. Für derartige Prozeduren werden jedoch neben der Sterilität sehr hohe Anforderungen daran gestellt, daß sich die Zelleigenschaften durch die Untersuchungen oder Analyse nicht verändern. So ist eine Markierung (z.B. für die Fluoreszenzerzeugung), wie sie bei der Immunofluorochromierung verwendet wird, ausgeschlossen, da die Folgereaktionen derart kontaminierter Zellen bei einer nachfolgenden Kultivierung oder im Empfängerorganismus nur schwer abschätzbar sind.

Es besteht ferner ein Interesse daran, Zelluntersuchungen spezifisch an Einzelzellen durchzuführen. Für ein statistisch ab-

gesichertes Untersuchungsergebnis muß eine genügend hohe Zahl von Einzelzellen untersucht werden. Daraus ergibt sich ein Bedarf an bisher nicht verfügbaren Paralleluntersuchungen an einer Vielzahl von Einzelzellen unter möglichst gleichartigen Bedingungen.

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, extrem belastungsarme, auch für den medizinischen Bereich einsetzbare Verfahren und Vorrichtungen zur Zelluntersuchung zu entwickeln, die mit möglichst vielen bereits erprobten hochspezifischen Nachweistechniken, wie z.B. Immunofluorochromierung von Proteinen, Nukleotiden und Lipiden, als auch zerstörenden Verfahren wie z.B. Röntgen- oder Elektronenstrahlmikroanalyse kombiniert werden können und die parallele Untersuchung einer Vielzahl von Einzelzellen erlauben. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, neue Anwendungen von Zellspuren anzugeben.

Diese Aufgabe wird durch Verfahren und Vorrichtungen mit den Merkmalen gemäß den Patentansprüchen 1 bzw. 17 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Verwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Die Grundidee der Erfindung besteht insbesondere darin, zur Untersuchung oder -kultivierung von biologischen Zellen oder deren Wechselwirkungen mit anderen Zellen oder Substanzen zunächst auf einer Substratoberfläche Zellspuren der zu untersuchenden Zellen zu erzeugen und dann diese Zellspuren der gewünschten Analyse oder Untersuchung zu unterziehen. Die Erzeugung von Zellspuren durch adhärent auf Oberflächen wachsende oder sich bewegende Zellen ist an sich bekannt und wird beispielsweise von E. D. Hay et al. in "Exp. Biol. Med.", Bd. 10, 1985, S. 174 ff., beschrieben. Die Strukturen und Eigenschaften von Zellspuren werden unten unter Bezug auf die Figuren 2 und 3 erläutert. Die Erzeugung der Zellspuren erfolgt vorzugsweise unter Verwendung von Substratoberflächen, die zu-

mindest teilweise in geeigneter Weise mikrostrukturiert und/oder modifiziert sind. Die Mikrostrukturierung der Substratoberfläche ist insbesondere dazu vorgesehen, die Zellspurerzeugung in bestimmten Substratbereichen, z.B. entlang bestimmter Pfade, zu fördern und in anderen Substratbereichen zu behindern oder auszuschließen. Die Oberflächenmodifizierung führt ferner dazu, daß nicht nur die auf natürliche Weise auf dem Substrat zurückbleibenden Materials Spuren untersucht werden können, sondern auch künstlich abgetrennte Materialrückstände (Erzielung größerer Spurmengen). Hierzu umfaßt die Substratmodifizierung insbesondere die Aufbringung von Molekülen, die Bindungsstellen anbieten, an denen spezifisch ein vorbestimmtes, gesuchtes Zelloberflächenmolekül ankoppeln kann.

Die erfindungsgemäß eingesetzten Untersuchungsmethoden umfassen alle an sich zur Zelluntersuchung und Zellbehandlung bekannten Techniken, wobei sowohl zerstörungsfreie als auch zerstörende Techniken oder gegebenenfalls biochemische Verstärkungstechniken (z.B. PCR-Prozeß) eingesetzt werden können.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung von Zellspuren zur Manipulierung der Wechselwirkung biologischer Zellen mit festen Substraten. Durch gezieltes Aufbringen von Zellspuren auf synthetischen oder biologischen Substraten entsprechend den in der vorliegenden Beschreibung erläuterten Prinzipien werden biokompatible Träger für die zu manipulierenden biologischen Zellen bereitgestellt. Die Manipulation besteht insbesondere in der gezielten Zellkultivierung (Gewebeaufbau) auf den mit Zellspuren belegten Substratbereichen.

Die erfindungsgemäß verwendeten Substratoberflächen können aus synthetischem, anorganischem oder organischem Material bestehen oder auch durch biologisches Material (z.B. Knochenmaterial) gebildet werden.

Die Erfindung besitzt die folgenden Vorteile. Es wird erstmalig ein einzelzellspezifisches Verfahren zur Zelluntersuchung angegeben, bei dem die untersuchte Zelle durch den Untersuchungsvorgang unbeeinflusst und unverändert bleibt. Dies erlaubt eine erhebliche Erweiterung der Anwendung von Einzelzelluntersuchungen in der Pharmakologie, Toxikologie, medizinischen Diagnostik und Biochemie. Die Zelluntersuchung kann hochgradig parallel an einer Vielzahl von Zellen durch gleichzeitige Erzeugung vieler Spuren auf einem Substrat durchgeführt werden. Da durch die Mikrostrukturierung der Oberflächen eine Zuordnung einer Zellspur zu einer untersuchten Zelle (Spenderzelle) möglich ist, bleibt die hochparallele Einzelzelluntersuchung ebenfalls zellspezifisch. Die Mikrostrukturierung der Substratoberfläche kann vorzugsweise nach Techniken erfolgen, wie sie an sich aus der Halbleiterprozessierung bekannt sind.

Erfindungsgemäß werden die Zellen außer durch die Spurenerzeugung durch keinerlei Färbungs- oder Markierungstechniken belastet. Sie sind damit nicht kontaminiert oder verändert und können einer medizinischen Verwendung bzw. einer Kryokonservierung oder einer weiteren Kultivierung unterworfen werden. Statt wie bisher in Zellen werden die Zellrückstände einer spezifischen Markierung oder Bewertung unterworfen. Diese kann durchaus auch zerstörend sein (z.B. schrittweiser enzymatischer Abbau) oder über Immunofluorochromierung in toxischen Konzentrationsbereichen erfolgen.

Die erfindungsgemäße Zellkultivierung besitzt den Vorteil, daß mit Zellspuren beliebige Substratmaterialien, wie sie beispielsweise für die Implantation von Knochenmaterialien von Interesse sind, biokompatibel gemacht werden können. Es werden neuartige Substrate zum in-vitro-Gewebeaufbau geschaffen, die einen erheblich erweiterten Anwendungsbereich besitzen. Durch die zellspurbasierte Modifikation von Substratoberflächen können anwendungsabhängig optimierte Zellkulturen auf optimierte

Substratmaterialien aufgebracht werden, die ohne die Zellspuren gegebenenfalls nicht miteinander kompatibel wären.

Weitere Ausführungsbeispiele und Vorteile der Erfindung werden im folgenden unter Bezug auf die beigefügten Zeichnungen beschrieben. Es zeigen

- Fig. 1 den prinzipiellen Aufbau eines erfindungsgemäßen zellspurbasierten Systems (Ausschnitt),
- Fig. 2 eine schematische Illustration der Grundstrukturen von Zellspuren in Form von Filamenten (A) und Membranflecken (B),
- Fig. 3 eine Illustration der Wirkungsweise eines modifizierten Substrats,
- Fig. 4 eine Illustration zur erfindungsgemäßen Fluoreszenzuntersuchung von Zellspuren,
- Fig. 5 ein Ausführungsbeispiel der Erfindung, bei dem das in Fig. 1 illustrierte Grundprinzip mit einer Vielzahl paralleler Bahnen realisiert ist,
- Fig. 6 ein weiteres Ausführungsbeispiel der Erfindung mit einer Vielzahl paralleler Zellbahnen, und
- Fig. 7 ein weiteres Ausführungsbeispiel der Erfindung mit sich kreuzenden Zellbahnen.

In Fig. 1 ist der prinzipielle Aufbau eines erfindungsgemäßen zellspurenbasierten Systems dargestellt. Ein Substrat 11 ist in seiner Oberfläche im μm - und mm -Bereich wie folgt strukturiert bzw. in seinen Oberflächeneigenschaften verändert.

Durch Bereiche 12 der Oberfläche, an denen Zellen nur schlecht adhäreren können, und Bereiche 13, 15, 17 (Bahn-Oberflächenbereiche), wo Zellen gut anhaften können, wird eine Vorzugsbahn gebildet, auf der sich eine Zelle 16 aktiv bewegen kann. Das Feld 15 im Bahn-Oberflächenbereich ist so modifiziert worden (chemisch, mechanisch etc.), daß hier die Zellen Teile ihrer Membran und inneren Bestandteile 14a, 14b verlieren, die am Substrat anhaften. Im gezeigten Beispiel sind es Filamente 14a und Membranflecken (oder Membranpatches) 14b, die unten unter Bezug auf die Fig. 2A und 2B im einzelnen erläutert werden. Die Zelle bewegt sich weiter in Richtung des Pfeiles 18. Die Zellspur kann nunmehr zerstörungsfrei oder zerstörend analysiert werden. Das zurückgelassene Material charakterisiert die Spenderzelle hinsichtlich der Membranzusammensetzung (Rezeptoren, Carrier, Lipide usw.), aber auch hinsichtlich innerer Bestandteile des Zytoplasmas, woraus sich medizinische, toxikologische, pharmakologische und andere Anwendungen ableiten lassen. Auf einer Bahn kann sich entweder eine oder mehrere Zellen bewegen und Spuren erzeugen.

Das Substrat 11 besteht beispielsweise aus Glas, Glimmer, anorganischem Kristallmaterial oder Halbleitermaterial. Die Substratoberfläche ist einerseits zur Ausbildung der Vorzugsbahn strukturiert bzw. modifiziert, auf der sich die Zelle bevorzugt bewegt und Zellspuren hinterläßt. Die Oberflächenbereiche 12, an denen Zellen nur schlecht adhäreren können, tragen beispielsweise eine Beschichtung mit negativ geladenen Molekülen, vorzugsweise aus Polymeren mit möglichst vielen OH^- -Gruppen, wie z. B. Poly-HEMA. Beispiele für die Beeinflussung der Bereiche 13, 15, 17, in denen die Zellen gut anhaften können, werden unten gegeben. Andererseits umfaßt die Mikrostrukturierung und/oder Modifizierung der Substratoberfläche eine örtlich selektive Beeinflussung der Vorzugsbahn zwischen den Bereichen 12 der Substratoberfläche. Die Segmentierung der Vorzugsbahn z.B. in die Bereiche 13, 15 und 17 ist dazu vorgesehen, daß je nach

der Gestaltung des jeweiligen Bereiches die Zellspuren besonders zahlreich oder besonders gering oder in Bezug auf eine bestimmte Zusammensetzung zurückgelassen werden. Dies wird auch aus den unten erläuterten Beispielen ersichtlich.

Die Mikrostrukturierung bzw. Modifizierung der Vorzugsbahn umfaßt beispielsweise:

1. Aufbringen von den molekularen Zellkontakt erhöhenden Schichten (z.B. Fibronectin, Polylysin, Alginate etc.). Die Schichtdicke kann anwendungsabhängig von der Dicke einer Moleküllage bis hin in den μm -Bereich gewählt werden. Die Molekülmonolagen werden vorzugsweise mit der Langmuir-Blodgett-Technik aufgebracht. Generell sind zur Schichtaufbringung auch Dickschichttechniken und/oder Plasmabehandlungen einsetzbar.
2. Nano- bzw. Mikrostrukturisierung von Oberflächen, d.h. Aufbringen von Mustern in nm- bzw. μm -Dimensionen, an denen Membranteile, insbesondere aber natürliche Kontaktmoleküle der Zelle, wie die der Integrin- und Catherinfamilie anhaften können (z.B. Strukturierung über die Photo- oder Elektronenstrahl-Lithographie).
3. Submikrometer und atomare Aufräuhung oder Reliefbildung auf Oberflächen (kleinste Widerhaken etc.).

Die Substratbeschickung (Aufbringung der Zellen) erfolgt beispielsweise durch Aufspülen aus einer Suspension, beispielsweise durch einen Kanal des Mikrosystems, mit einem Manipulator (Kapillare, separates Mikrosystem oder optische Pinzette) oder auch durch aktives Aufwachsen.

Bei der Wanderung der Zellen über Substratoberflächen (z.B. über eine saubere Glasoberfläche) hinterlassen die Zellen unter

physiologischen Bedingungen filamentöse oder fleckenartige Spuren, die im folgenden als Filament bzw. Membranfleck bezeichnet und unter Bezug auf die Fig. 2A bzw. 2B erläutert werden. Die Spuren sind in der Regel Strukturen, die membranumhüllt und mit Zellinhalten gefüllt sind. Typische Größen dieser Strukturen liegen in Bezug auf die Breite und Höhe im μm - und Sub- μm -Bereich. Während die Länge eines Membranflecks in der Regel im wesentlichen seiner Breite entspricht, ist die Länge eines Filaments variabel. Die Filamentlänge kann bis zu einige Millimeter betragen. Die interessierenden Bestandteile der Zellen, die auch in den Zellspuren auffindbar sind, sind Membranproteine 210, Oberflächenproteine und -rezeptoren 211, 212, Zytoplasmabestandteile 213, 214 und die Lipide 215 in der Membran (s. Fig. 2A). Bei den Membranflecken treten neben diesen Bestandteilen, die in Fig. 2B z.B. die Membranproteine 220 und die Lipidzusammensetzung 225 umfassen, ferner Vesikeln 221, Organellen 222 und genetisches Material 223 auf. Außerdem ist auch Zytoplasma 224 vorhanden. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde erstmalig festgestellt, daß die Zellspuren analysfähiges Material, das u.a. die genannten Bestandteile umfaßt, in ausreichender Menge enthalten. Dies bedeutet, daß die an sich bekannten Analyse- oder Untersuchungsverfahren vorteilhafterweise ohne gesonderte Anreicherungsschritte implementiert werden können.

Die Oberflächenproteine und -rezeptoren 211, 212 umfassen beispielsweise ein Spurenprotein 211 in der Membran und einen angekoppelten Rezeptor 212 mit einer chromophoren Gruppe. Vom Rezeptor 212 wird bei geeigneter Lichtanregung Fluoreszenzlicht ausgestrahlt, das das Vorhandensein des Spurenproteins 211 anzeigt. Da die Rezeptorankopplung proteinspezifisch erfolgt, kann mit dem Fluoreszenzlicht der in der Spur vorhandene Proteinkomplex nachgewiesen werden.

In analoger Weise lassen sich auch andere Nachweistechiken implementieren, wie sie beispielsweise bei den ELISA- und RIAS-Assays vorgesehen sind.

Erfindungsgemäß erfolgt somit an den Zellspuren der spezifische Nachweis bestimmter Bestandteile der Spenderzelle. Die Bestandteile können auf der Oberfläche oder im Inneren der Zellspuren angeordnet sein. Im letzteren Fall ist vorgesehen, die Membran der Zellspur mit geeigneten Lösungsmitteln aufzulösen oder mechanisch oder elektrisch zu permeieren. Die zerstörende Messung an den Zellspuren ohne Veränderung der Spenderzelle zur Erfassung von molekularen oder mikroskopischen Bestandteilen in den Zellspuren stellt einen besonderen Vorteile der Erfindung dar.

Die zellspurbasierten Analysen sind in besonderer Weise zur Kombination mit hochempfindlichen Meßtechniken geeignet. Diese umfassen beispielsweise die Fluoreszenz-Korrelationsanalyse zum Einzelmolekülnachweis und zur Bestimmung von Bindungskonstanten, die Massenspektrometrie zur Elementaranalyse und die konfokale Laserscanningmikroskopie. Genetisches Material in den Spuren kann z.B. über einen PCR-Prozeß amplifiziert werden, wodurch eine neuartige, die Spenderzelle in ihren physiologischen Zellen nicht beeinflussende Technik einer genetischen Analyse gegeben ist.

Für einzelzellbasierte Assays und Nachweisverfahren können auch die folgenden Prozeduren angewendet werden.

1. Die Menge der Zellrückstände wird als quantitatives Maß für die Stärke des Anhaftens der Spenderzelle an der Substratoberfläche und somit für die Menge bestimmter Bindungskomplexe in deren Membran erfaßt.
2. Die Spurenstruktur wird als Maß erfaßt, z.B. die Verhält-

nisse des Anteils an Filamenten zum Anteil an Verzweigungen, zum Anteil an Patches usw. (Vergleich von Zellspurgrundelementen in ihrer Quantität).

3. Die Materialzusammensetzung der Spuren wird als Maß erfaßt, z.B. Lipid/Proteinanteil, spezifisches Auftreten bestimmter Rezeptoren (u.a. der Immunglobulinfamilien), spezifisches Auftreten von Lipiden, Nukleotiden etc.
4. Charakterisierung zytoplasmatischer Rückstände, insbesondere genetischen Materials in den Rückständen der Zellen.
5. Vergleich von Änderungen in einem der Punkte 1 bis 4 nach Behandlung der spurerzeugenden Zelle (z.B. mit Pharmaka, toxischen Substanzen etc.).
6. Die Stabilität der Spur gegen mechanische, elektrische, akustische, optische oder chemische Behandlungen wird als Maß erfaßt.
7. Die Elementzusammensetzung der Spuren oder Teile derselben (z.B. Na, K, P...) werden als Maß erfaßt.
8. Passive elektrische Parameter der Zellrückstände, wie Impedanz, Durchschlagsfestigkeit, nichtlineares Verhalten oder Erwärmung werden als Maß erfaßt.
9. Optische Parameter der Spuren werden als Maß erfaßt, wie Absorption, Transmission, nichtlineare Eigenschaften etc.
10. Mechanische Eigenschaften der Spuren, wie Elastizität, Plastizität usw. werden als Maß erfaßt.
11. Die Veränderung einer Zellspur durch eine nachfolgende Zelle der gleichen oder einer anderen Art wird als Maß

erfaßt.

12. Die Spurcharakterisierung erfolgt nach einer Fixierung bzw. Kontrastierung, z.B. mittels hochauflösender Mikroskopverfahren (Rasterelektronenmikroskopie, AFM, SNOM etc.).
13. Ein Negativ oder anderes Duplikat oder eine Vervielfachung von Spurenteilen wie bei der PCR-Technik wird als Maß für den Vergleich benutzt.
14. Die Adhäsion anderer Materialien, wie hochspezifisch bindender Beads oder nm-Teilchen werden als Maß für den Vergleich erfaßt.

Die hier genannten Maße werden als für die Spenderzellen spezifischer Größen erfaßt, die bei gegebenen Vergleichswerten eine Charakterisierung der Spenderzelle oder bei Vergleich der Maße mit den entsprechenden Ergebnissen bei anderen Zellen zur Charakterisierung des unterschiedlichen Verhaltens der Zellen verwendet werden.

Im folgenden werden unter Bezug auf die Fig. 3 bis 7 Ausführungsformen erfindungsgemäßer Vorrichtungen erläutert. Dabei wird auf Einzelheiten der erfindungsgemäß eingesetzten Substratoberflächen eingegangen. Nicht dargestellt sind Einzelheiten einer Gesamtapparatur zur Zellspuruntersuchung, da diese in Bezug auf die Handhabung von Assays bzw. von mit Proben beschickten Substraten und die Anpassung an die jeweils gewünschten Untersuchungsmethoden an sich bekannt sind.

Die Fig. 3 und 4 sind schematische Schnittansichten von Substraten 31, 41, die jeweils mit einer Modifizierungsschicht 32 bzw. 42 im Bahn-Oberflächenbereich 35 bzw. 45 zur bevorzugten Anhaftung von Zellen und Hinterlassung von Zellspuren 34 bzw. 44 ausgestattet sind. Die Modifizierungsschicht 32 (bzw. 42)

bietet Bindungsstellen an, an denen spezifisch ein vorbestimmtes, gesuchtes Zelloberflächenmolekül 33 (bzw. 43) ankoppeln kann. Eine Zelle, die derartige Moleküle in ausreichender Zahl besitzt, wird dementsprechend fester gebunden sein und mehr Spurenmaterial 34 (bzw. 44) bei ihrer Wanderung über das Substrat zurücklassen als andere Zelltypen. Die Erfassung der Menge des zurückgelassenen Materials (z.B. mit optischen Mitteln) liefert eine Aussage über den Gehalt des vorbestimmten Zelloberflächenmoleküls an der untersuchten Zelle. Die Zelle selbst wird durch die Messung nicht belastet.

Falls die Menge des Zellspurmaterials zu gering für eine sichere direkte Auswertung ist, so kann die Zellspurvermessung gemäß Fig. 4 modifiziert sein. Nach der Erzeugung der Zellspuren 44 werden diese mit der Lösung eines Fluoreszenzmarkers behandelt, der als Markermolekül 46 z.B. in die Lipidteile der Zellspur 44 unspezifisch eingebaut wird. Bei geeigneter Lichtanregung und Fluoreszenzmessung kann aus der Intensität des Fluoreszenzlichts auf die Zahl der Markermoleküle 46 und damit auf die quantitative Menge des Zellspurmaterials 44 rückgeschlossen werden.

Die Vorzugsbahn gemäß Fig. 1 bzw. der modifizierte Bahn-Oberflächenbereich 35 (oder 45) gemäß den Fig. 3 (oder 4) können einfach oder mehrfach mit den verschiedensten Geometrien auf dem Substrat ausgebildet sein. Im folgenden werden gerade Vorzugsbahnen beschrieben. Es sind jedoch bei geeigneter Substratstrukturierung auch gekrümmte (z.B. kreisförmige) Vorzugsbahnen möglich.

Fig. 5 zeigt ein Beispiel für eine parallele Ausführung des in Fig. 1 erläuterten Grundprinzips mit einer Vielzahl parallel verlaufender, gerader Vorzugsbahnen.

Auf einem Substrat 51, das z.B. aus Glas, Silizium oder Kunststoff bestehen kann, sind die Zelladhäsion unterbindende Materialien 52 aufgebracht.

Dadurch entstehen eine Vielzahl von Bahnen 57 (Bahn-Oberflächenbereiche), auf denen sich Zellen adhärent bewegen können. Die Bahnen 57 reichen von Eingangsdepots 53 über Oberflächenfelder 55 bis hin zu Ausgangsdepots 58. Die Oberflächenfelder 55 sind so behandelt, daß bevorzugt Zellspuren erzeugt werden. Erreichen die Zellen die ebenfalls für die Adhäsion präparierten Ausgangsdepots 58, so werden sie dort festgehalten bzw. entnommen, um einer Kultivierung, Kryokonservierung oder einer anderen Prozedur unterzogen zu werden. Die Analyse der Spur kann mit allen gängigen Mikronachweisverfahren erfolgen (Fluoreszenz, Isotopenmarkierung, Elementanalyse etc.). Die Oberflächenfelder 55 mit den Zellspuren (nicht dargestellt) sind als Segmente der Bahnen 57 als Reihe, jeweils mit dem gleichen Abstand von dem jeweiligen Eingangsdepot 53 angeordnet. Dies erleichtert die parallele, simultane Auswertung der Zellspuren.

In Fig. 6 ist eine Substratoberfläche in Form eines Mikrosystems gezeigt, die in ähnlicher Weise in verschiedene Oberflächenbereiche kompartmentiert wurde, wie das in Fig. 5 der Fall ist. Das Substrat besteht hier jedoch entweder aus zwei Teilen 61a, 61b oder einem Teil mit einer Sollbruchstelle 61c. Auf den Feldern 65 hinterlassen die Zellen Spuren. Sind sie auf ihrer Wanderung über das Substrat in den Ausgangsdepots 68 angekommen, so wird das Teil 61b entfernt oder abgebrochen. Wie im linken Teil von Fig. 6 gezeigt ist, befinden sich dann die Spuren und Zellen auf jeweils getrennten Substraten 31 und 32, so daß sie auf verschiedene Weise weiterbehandelt werden können.

In Analogie zu diesen Ausführungen lassen sich Oberflächen mit weitaus mehr Zellwegen erzeugen, in denen parallel die Spuren

vieler Zellen so, daß sie eindeutig zuzuordnen sind, erzeugt und charakterisiert werden können.

Fig. 7 zeigt eine Substratoberfläche, die derart strukturiert ist, daß sich zwei Vorzugsbahnen, die für die Wanderung der Spenderzellen eingerichtet sind, kreuzen. Auf dem Substrat 71 verlaufen die Bahnen 77a und 77b im wesentlichen senkrecht zueinander. Im Kreuzungsbereich 75 ist eine Oberflächenmodifizierung oder -strukturierung zur Förderung des Anhaftens von Zellspuren angebracht, wie sie oben erläutert wurde. Außerhalb der Bahnen 77a bzw. 77b ist das Substrat 71 so strukturiert, daß dort keine Zellwanderung stattfindet und keine Zellspuren anhaften.

Mit der in Fig. 7 gezeigten Anordnung lassen sich vorzugsweise Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zellen untersuchen. Es kann z.B. vorgesehen sein, daß zunächst die Zelle 76a über den Bereich 75 wandert und dort Zellspuren hinterläßt. Anschließend wandert die Zelle 76b über denselben Bereich 75 mit den vorhandenen Zellspuren. Mit einem optisch-mikroskopischen Verfahren oder einem anderen Untersuchungsverfahren wird danach erfaßt, ob die Spuren der ersten Zelle 76a durch die zweite Zelle 76b verändert, überlagert oder entfernt wurden. Es kann ferner erfaßt werden, ob geometrische Korrelationen zwischen den Zellspuren auftreten, d.h. ob die Nachfolgezellen den Spuren der Vorgängerzellen folgen oder diese gerade meiden. Daraus lassen sich wiederum zellbasierte Assays für die Medizin, Biotechnologie und Pharmazie mit hoher Spezifik entwickeln. Ein Substrat mit gekreuzten Bahnen läßt sich wiederum zur Erzielung einer Parallelverarbeitung vielfach auf einem gemeinsamen Träger ausbilden.

Die Herstellung eines erfindungsgemäßen Substrats erfolgt vorzugsweise derart, daß zunächst ein Trägermaterial mit einer Beschichtung versehen wird, die für die Zellwanderung und

-adhäsion ungünstig ist (z.B. stark negativ geladene Moleküle). Anschließend wird diese Beschichtung entsprechend dem gewünschten Verlauf der Vorzugsbahnen durch Abtragen strukturiert, so daß das Trägermaterial entsprechend bestimmter geometrischer Formen frei liegt, die dann die Vorzugsbahnen bilden. Anschließend erfolgt anwendungsabhängig die Segmentierung der Vorzugsbahn, d.h. die Aufbringung einer Strukturierung und/oder Modifizierung des Trägermaterials zur verstärkten Zelladhäsion.

Die Bahnbreiten sind vorzugsweise an die charakteristische Ausdehnung einer adhärierten Zelle angepaßt und betragen rd. 50 µm. Die Bahnlängen können ebenfalls anwendungsabhängig ausgewählt werden. Sie betragen z.B. 3 bis 4 charakteristische Zelldurchmesser (d.h. rd. 150 bis 200 Mikrometer) bis hin zu größeren Längen im Millimeterbereich.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung erfolgt eine Aufbringung von Zellspuren auf Substraten zur Zellkultivierung. Als Substrate werden ebene oder anwendungsabhängig gekrümmt geformte Festkörpermateriale synthetischen oder biologischen Ursprungs verwendet. Es werden beispielsweise Glas-, Keramik- oder Kunststoffmaterialien oder auch polierte Knochenscheiben als Substrat verwendet. Um die jeweiligen Substratoberflächen mit einem biokompatiblen Überzug zu versehen, werden nach den oben erläuterten Prinzipien gewebeerzeugende Zellen, wie z.B. Chondrozyten, Osteoplasten oder Epithelzellen auf die Substratoberflächen aufgesetzt, um auf dieser unter Hinterlassung von Zellspuren zu wandern. Die Substratoberfläche kann zur Aufbringung möglichst umfangreicher Zellspuren strukturiert oder anderwertig modifiziert sein (s. oben). Nach Ausbildung einer geschlossenen Zellspuroberfläche erfolgt auf dem modifizierten Substrat ein Gewebeaufbau. Gewebeerzeugende Zellen, vorzugsweise des Typs, mit dem die Zellspuren erzeugt wurden, werden auf dem modifizierten Substrat kultiviert. Ein

Substrat mit kultivierten Gewebezellen wird dann anwendungsabhängig als Implantat in den menschlichen Körper eingesetzt.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur zellspurbasierten Untersuchung biologischer Zellen, bei dem die Zellen (16, 76a, 76b) auf ein zumindest teilweise strukturiertes und/oder oberflächenmodifiziertes Substrat (11, 31, 41, 51, 61, 71) aufgebracht werden und sich adhärent über Bahn-Oberflächenbereiche (13, 15, 17, 35, 45, 55, 57, 77a, 77b) des Substrats unter Erzeugung von Zellspuren (14a, 14b, 34, 44) bewegen, die aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen, und Zelluntersuchungen an den Zellspuren durchgeführt werden.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem zur Zelluntersuchung die Menge, die Geometrie, die chemische Zusammensetzung, die passiven elektrischen Parameter und/oder mechanische Eigenschaften der Zellspuren oder von deren Bestandteilen erfaßt werden.

3. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem zur Erfassung der Menge und Geometrie der Zellspuren Filamente (14a) und Membranflecken (14b) erfaßt werden.

4. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem zur Erfassung der Zusammensetzung der Zellspuren diese einer Färbung oder Markierung zur Durchführung mikroanalytischer Verfahren unterzogen werden.

5. Verfahren gemäß Anspruch 4, bei dem die mikroanalytischen Verfahren Fluoreszenzmessungen, Messungen auf der Basis von Isotopenmarkierungen oder Elementanalysen umfassen.

6. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem zur Erfassung der Zusammensetzung der Zellspuren diese einem enzymatischen Abbau unterzogen werden.

7. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem die Zellspuren mit einem hochauflösenden Mikroskopieverfahren untersucht werden.

8. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem zytoplasmatische Rückstände oder genetischen Materialien in den Zellspuren erfaßt werden.

9. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem die Stabilität der Zellspuren bei mechanischen, elektrischen, akustischen, optischen und/oder chemischen Behandlungen erfaßt wird.

10. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem zur Erfassung der passiven elektrischen Parameter der Zellspuren deren Impedanz, Durchschlagfestigkeit, nichtlineares Verhalten und/oder Erwärmung bei Stromdurchfluß erfaßt werden.

11. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem zur Erfassung mechanischer Eigenschaften der Zellspuren deren Elastizität oder Plastizität erfaßt werden.

12. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem eine Vervielfachung von Bestandteilen der Zellspuren zur Erzeugung von Referenzmaterial durchgeführt wird.

13. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Zellspuren in vorbestimmten Bahn-Oberflächenbereichen (13, 15, 17, 35, 45, 55, 57, 77a, 77b) erzeugt werden, die zumindest teilweise zur verstärkten Anhaftung der Zellen mikrostrukturiert und/oder modifiziert sind.

14. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Zellen nach der Erzeugung der Zellspuren einer medizinischen oder meßtechnischen Verwendung, einer Kryokonservierung oder einer weiteren Kultivierung unterzogen werden.

15. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem auf einer Vielzahl paralleler Bahnen eine Vielzahl von Zellspuren erzeugt und untersucht werden.

16. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem auf sich kreuzenden Bahnen Zellspuren erzeugt und an Kreuzungsbereichen der sich kreuzenden Bahnen die gegenseitigen Wechselwirkungen der beteiligten Zellen und/oder Zellspuren untersucht werden.

17. Vorrichtung zur zellspurbasierten Untersuchung biologischer Zellen (16, 76a, 76b) mit einem Substrat (11, 31, 41, 51, 61, 71) mit Oberflächenbereichen (12, 52, 72), an denen die Zellen schlechter adhärieren als auf Bahn-Oberflächenbereichen (13, 15, 17, 35, 45, 55, 57, 77a, 77b), in denen die Zellen gut anhaften und sich adhärent bewegen können, wobei die Bahn-Oberflächenbereiche zur Anhaftung von Zellspuren (14a, 14b, 34, 44) eingerichtet sind, die aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen.

18. Vorrichtung gemäß Anspruch 17, bei der das Substrat in den Oberflächenbereichen (12, 52, 72) und/oder den Bahn-Oberflächenbereichen (13, 15, 17, 35, 45, 55, 57, 77a, 77b) strukturell und/oder chemisch modifiziert ist, um die Anhaftung von Zellspuren zu unterbinden bzw. zu fördern.

19. Vorrichtung gemäß Anspruch 17, bei der das Substrat Teil eines Mikrosystems ist, auf dem die Oberflächenbereiche und die Bahn-Oberflächenbereiche ausgebildet sind, wobei die Bahn-Oberflächenbereiche mindestens eine gerade Bahn bilden.

20. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 17 bis 19, bei dem das Substrat aus Glas, Silizium oder einem Kunststoff besteht.

21. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 17 bis 20, bei der eine Vielzahl von Bahn-Oberflächenbereichen in Form einer Gruppe paralleler Bahnen (57) oder sich kreuzender Bahnen (77a, 77b) gebildet sind.

22. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 17 bis 21, bei dem das Substrat zweiteilig ist, wobei die Bahn-Oberflächenbereiche auf einem der Substratteile angeordnet sind.

23. Verfahren zur zellspurbasierten Kultivierung biologischer Zellen, bei dem die Zellen (16) auf ein zumindest teilweise strukturiertes und/oder oberflächenmodifiziertes Substrat (11) aufgebracht werden und sich adhärent über die Oberfläche des Substrats unter Erzeugung von Zellspuren (14a, 14b) bewegen, die aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen, und auf den Zellspuren eine Kultivierung von Zellen gleichen oder andersartigen Typs durchgeführt wird.

24. Verfahren gemäß Anspruch 24, bei dem die biologischen Zellen gewebeerzeugende Zellen und das Substrat ein Implantatmaterial umfassen.

25. Verwendung von Materialrückständen, die von biologischen Zellen auf Substraten gebildet sind, zur Untersuchung von Eigenschaften der Zellen für medizinische, biochemische und/oder pharmakologische Zwecke, oder zur biokompatiblen Modifizierung der Oberflächen von Implantatmaterialien.

ZUSAMMENFASSUNG

Zur zellspurbasierten Untersuchung biologischer Zellen, bei dem die Zellen (16) auf ein zumindest teilweise strukturiertes und/oder oberflächenmodifiziertes Substrat (11) aufgebracht werden und sich adhärent über Bahn-Oberflächenbereiche (13, 15) des Substrats unter Erzeugung von Zellspuren (14a, 14b) bewegen, die aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen, werden Zelluntersuchungen an den Zellspuren durchgeführt. Es wird auch ein Verfahren zur Zellkultivierung auf biokompatibel modifizierten Substraten beschrieben, deren Oberflächen von Zellspuren bedeckt sind.

(Fig. 1)

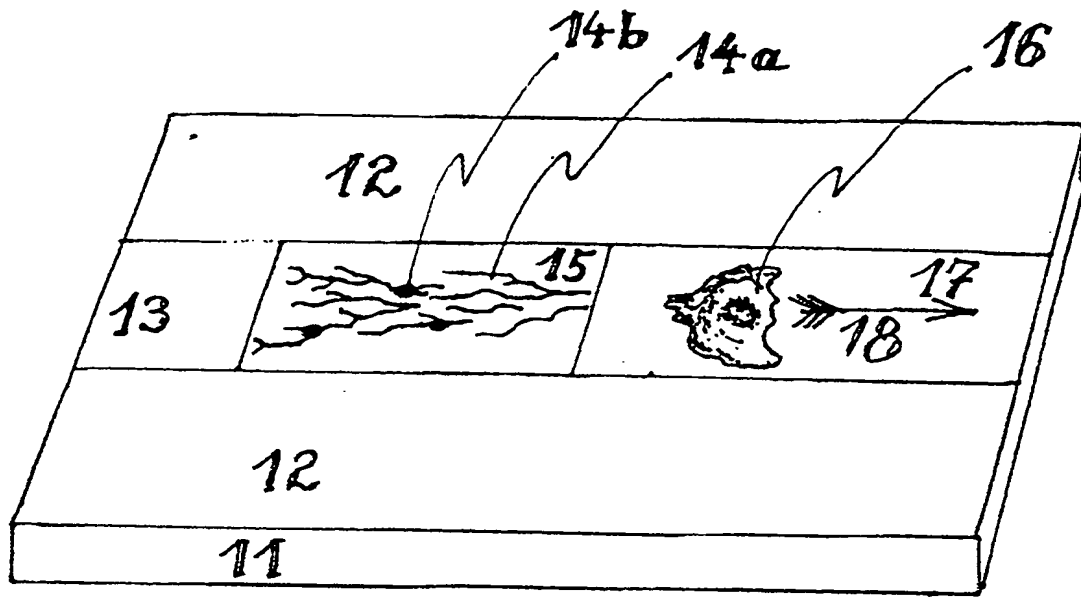


Fig. 1

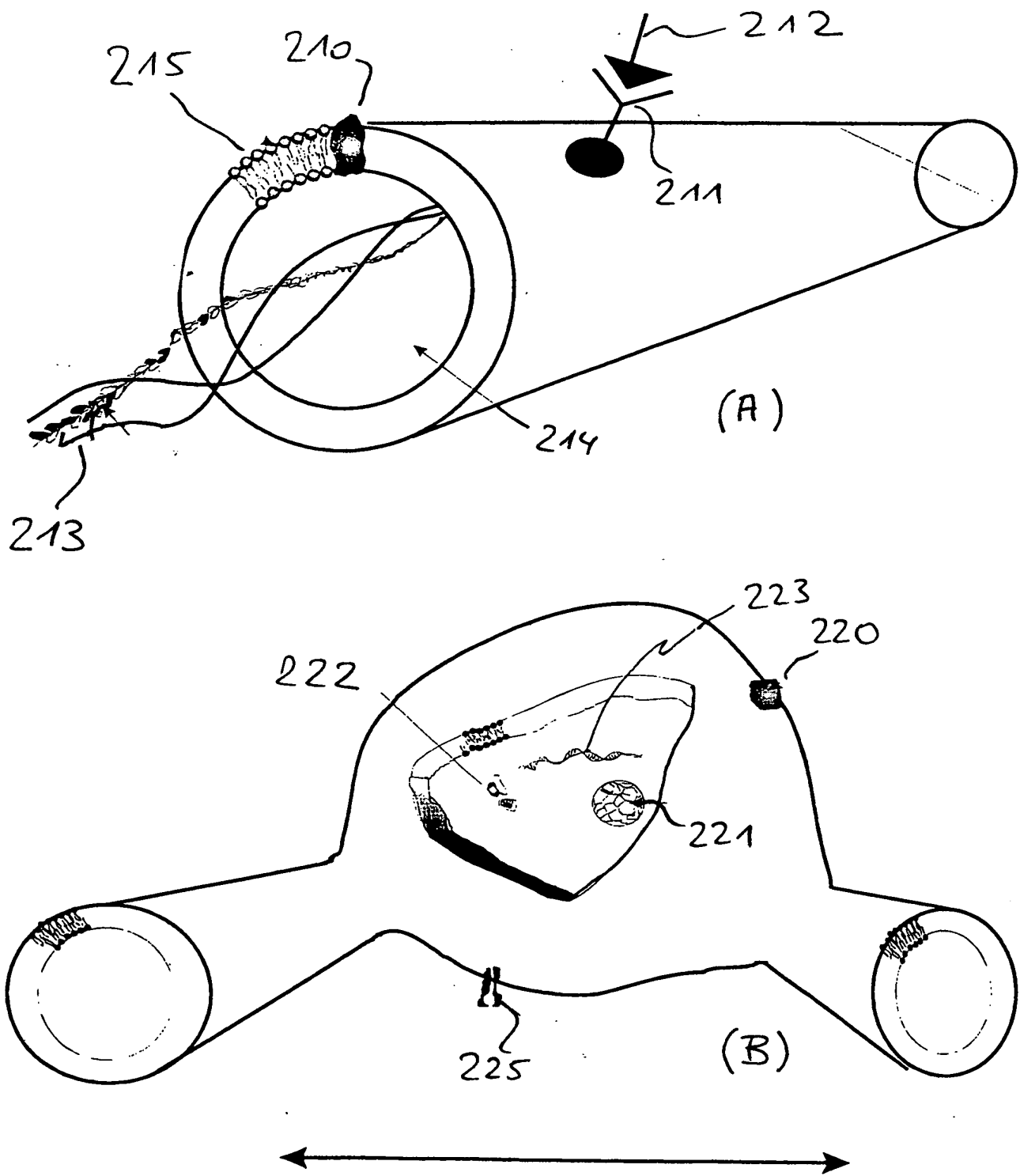


Fig. 2

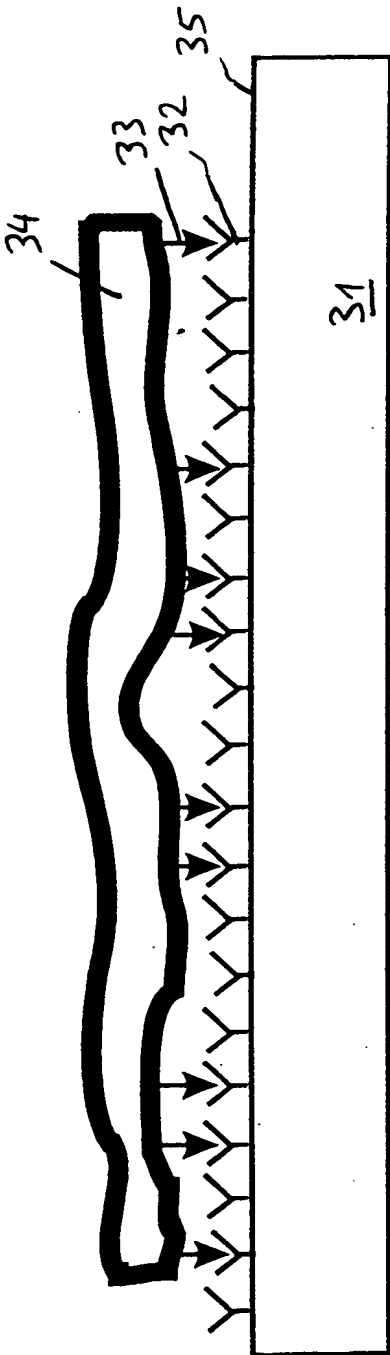


Fig. 3

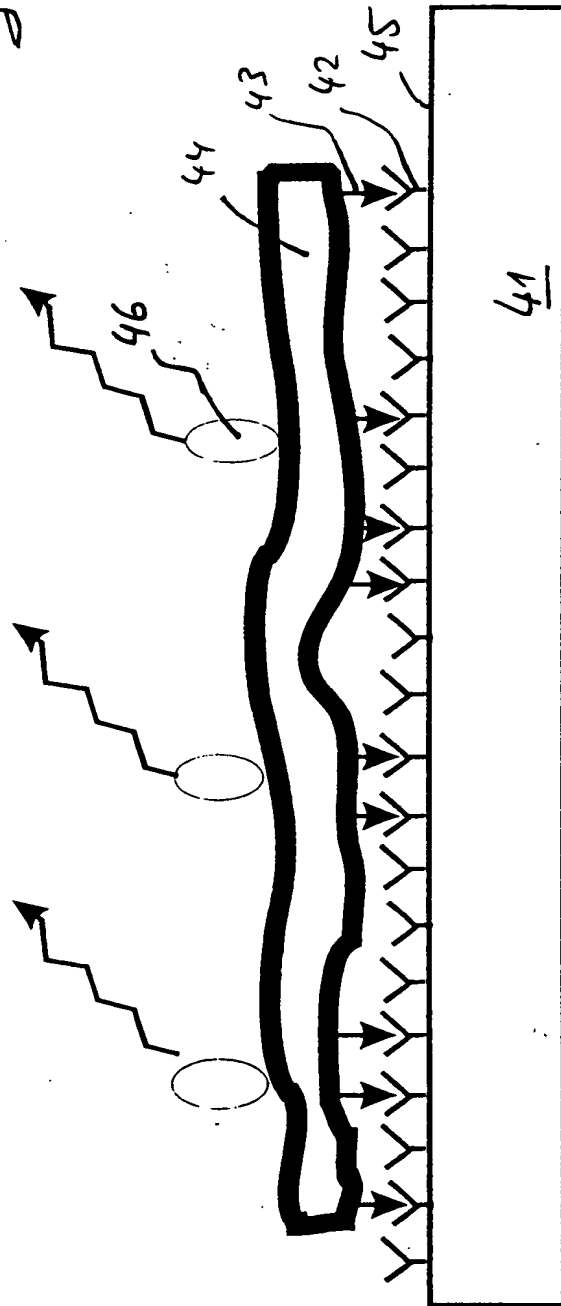


Fig. 4

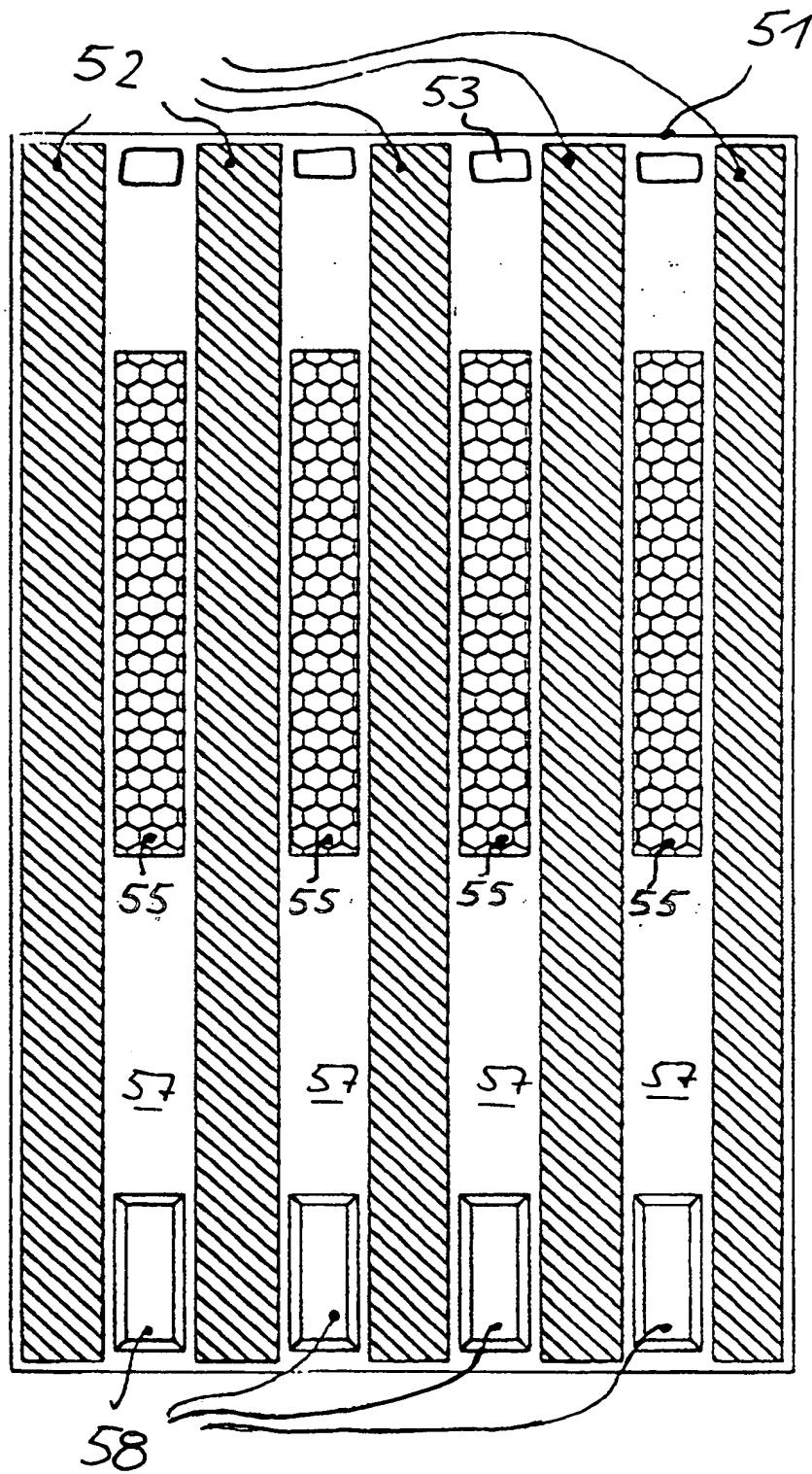


Fig. 5

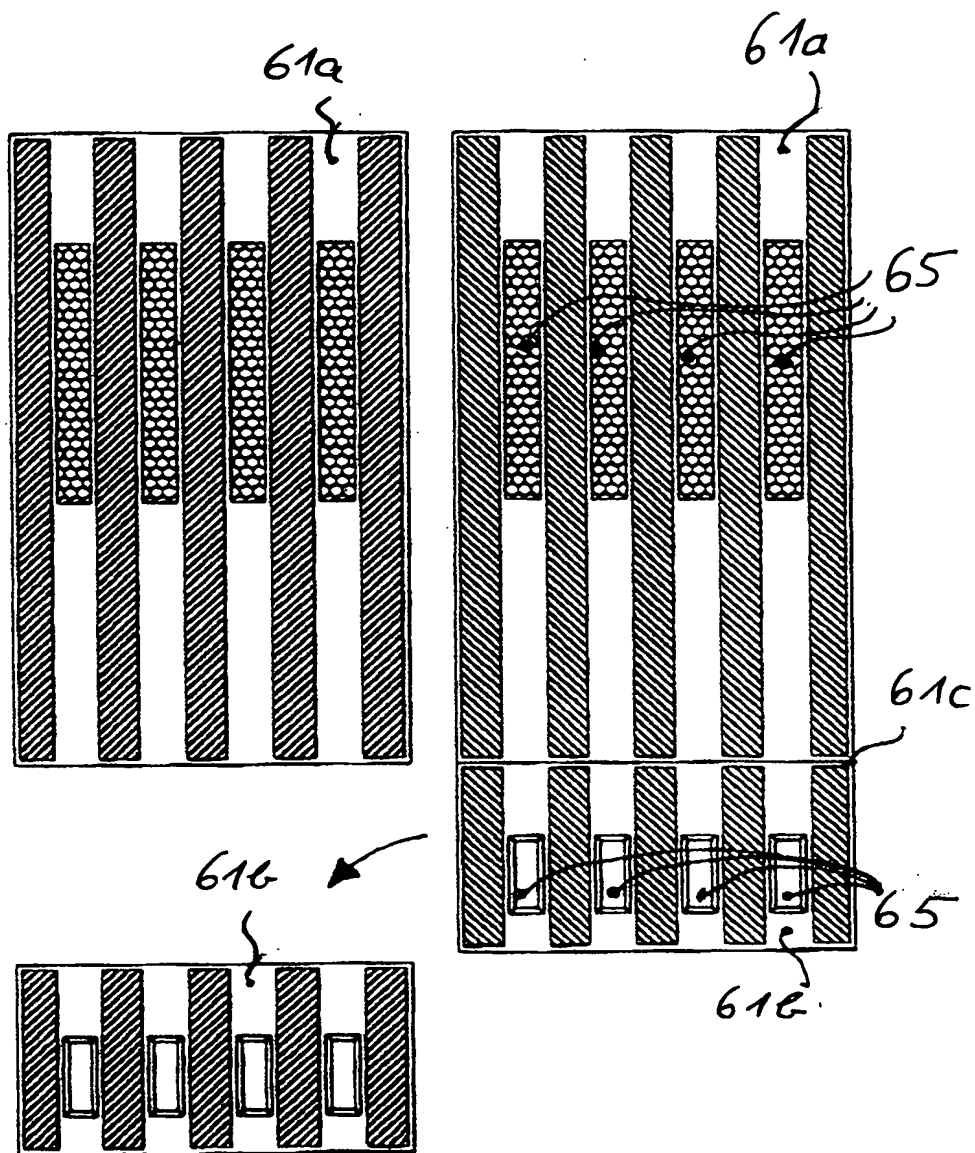
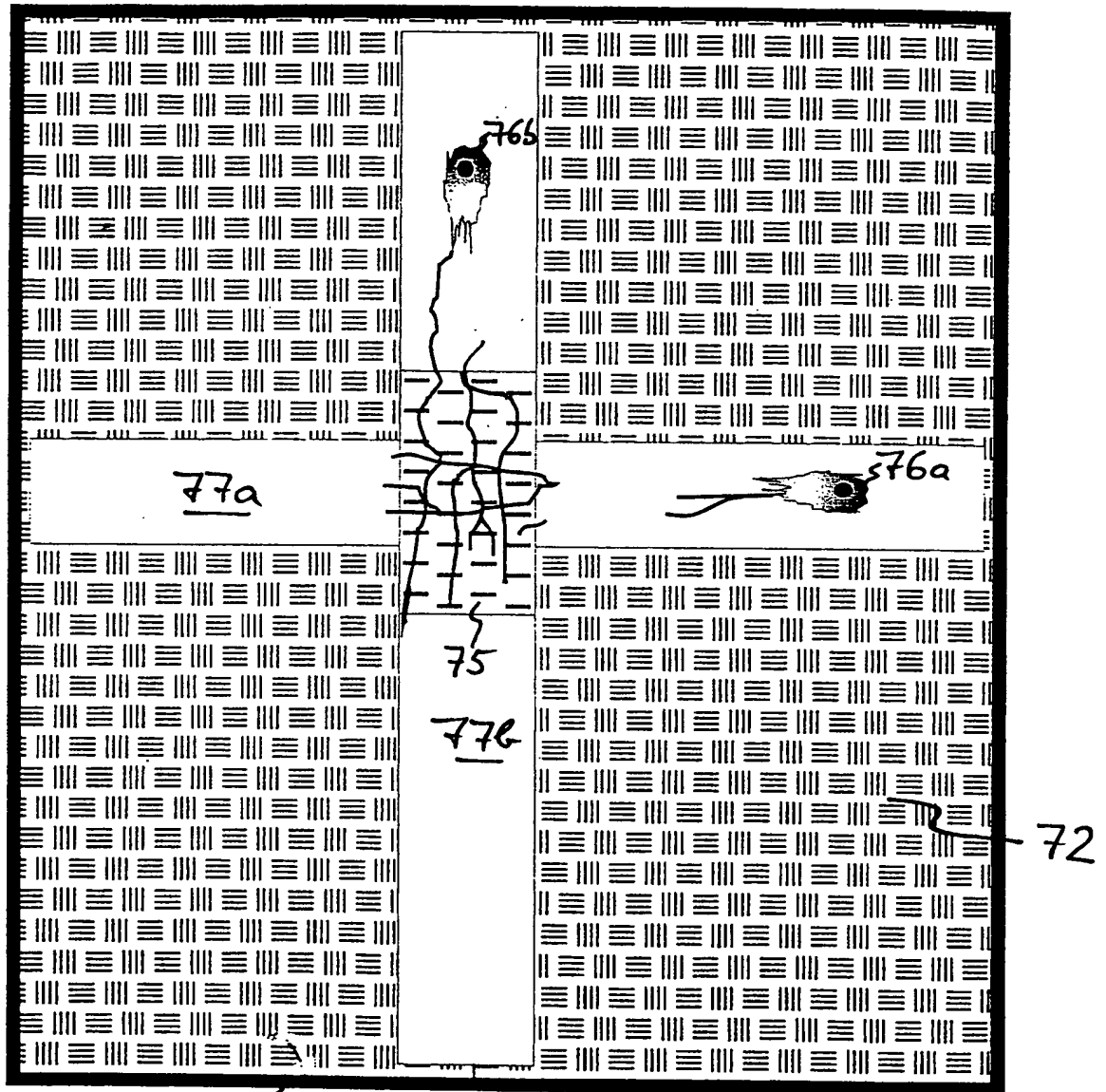


Fig. 6



71

Fig. 7

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 14692/PCT R1	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99/ 09781	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 10/12/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 14/12/1998
Anmelder EVOTEC BIOSYSTEMS AG et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbaren **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

☒ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N33/483 C12N5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 4 359 527 A (ZETTER BRUCE R) 16. November 1982 (1982-11-16) Spalte 1, Zeile 64 - Spalte 2, Zeile 8	1, 2
Y	---	4, 5, 13, 17-20
Y	EP 0 347 210 A (BECTON DICKINSON CO) 20. Dezember 1989 (1989-12-20) Seite 1, Zeile 52 - Seite 2, Zeile 4	4, 5
X	FR 2 743 421 A (AETSRN) 11. Juli 1997 (1997-07-11) Seite 2, Zeile 30 - Seite 3, Zeile 8 Anspruch 1	1, 2, 7

	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

21. März 2000

Absenddatum des Internationalen Recherchenberichts

28/03/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentkanal 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Krametz, E

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 96 15223 A (UNIV LOUVAIN ;DEWEZ JEAN LUC (BE); LHOEST JEAN BENOIT (BE); DETRAI) 23. Mai 1996 (1996-05-23) Seite 3, Zeile 20 -Seite 7, Zeile 17 Abbildung 1	13,17-20
A	-----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/09781

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 4359527	A	16-11-1982	NONE		
EP 0347210	A	20-12-1989	US	5047321 A	10-09-1991
			AT	111227 T	15-09-1994
			AU	613197 B	25-07-1991
			AU	3596189 A	21-12-1989
			CA	1340170 A	08-12-1998
			DE	68918004 D	13-10-1994
			DE	68918004 T	05-01-1995
			DK	296889 A	16-12-1989
			ES	2063820 T	16-01-1995
			FI	892926 A, B,	16-12-1989
			JP	2009578 C	02-02-1996
			JP	2073157 A	13-03-1990
			JP	7026954 B	29-03-1995
			NO	175506 B	11-07-1994
FR 2743421	A	11-07-1997	AU	1383197 A	01-08-1997
			EP	0879414 A	25-11-1998
			WO	9725617 A	17-07-1997
WO 9615223	A	23-05-1996	BE	1008955 A	01-10-1996
			EP	0800574 A	15-10-1997
			US	5962136 A	05-10-1999

Der Antrag ist bei der zuständigen mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde oder, wenn zwei oder mehr Behörden zuständig sind, bei der vom Anmelder gewählten Behörde einzureichen. Der Anmelder kann den Namen oder den Zweibuchstaben-Code der Behörde auf der nachstehenden Zeile angeben.

IPEA/ _____

PCT

KAPITEL II

ANTRAG AUF INTERNATIONALE VORLÄUFIGE PRÜFUNG

nach Artikel 31 des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens:
Der (die) Unterzeichnete(n) beantragt (beantragen), daß für die nachstehend bezeichnete internationale Anmeldung die internationale vorläufige Prüfung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens durchgeführt wird.

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

Bezeichnung der IPEA	Eingangsdatum des ANTRAGS
----------------------	---------------------------

Feld Nr. I KENNZEICHNUNG DER INTERNATIONALEN ANMELDUNG		Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 14692/PCT Ri
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/09781	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 10/12/1999	(Frühester) Prioritätstag (Tag/Monat/Jahr) 14/12/1998
Bezeichnung der Erfindung Verfahren und Vorrichtung zur zellsprbasierten Zelluntersuchung und Zellkultivierung		
Feld Nr. II ANMELDER		
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) EVOTEC BioSystems AG Schnackenburgallee 114 D-22525 Hamburg (DE)		Telefonnr.: Telefaxnr.: Fernschreibnr.:
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) Fuhr, Günter Kavalierstraße 15 D-13187 Berlin (DE)		
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) Hagedorn, Rolf Wartiner Straße 16 D-13057 Berlin (DE)		
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Anmelder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.		

Fortsetzung v n Feld Nr. II ANMELDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

Shirley, Stephen, Graham
Victoria Main Street
Brandon, Warwickshire CV8 3NW (GB)

Staatsangehörigkeit (Staat):

GB

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

GB

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

Richter, Ekkehard
Walkürenstraße 3A
D-10318 Berlin (DE)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

☐

Weitere Anmelder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. III ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT

- Die folgende Person ist ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter
- und ☒ ist vom (von den) Anmelder(n) bereits früher bestellt worden und vertritt ihn (sie) auch für die internationale vorläufige Prüfung.
- ☐ wird hiermit bestellt; eine etwaige frühere Bestellung eines Anwalts/gemeinsamen Vertreters wird hiermit widerrufen.
- ☐ wird hiermit zusätzlich zu dem bereits früher bestellten Anwalt/gemeinsamen Vertreter, nur für das Verfahren vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde bestellt.

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

Hertz, Oliver
v. Bezold & Sozien
Akademiestraße 7
D-80799 München (DE)

Telefonnr.:

089 / 3899980

Telefaxnr.:

089 / 38999850

Fernschreibnr.:

- ☐ Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben wird.

Feld Nr. IV ERKLÄRUNG BETREFFEND ÄNDERUNGEN

Der Anmelder wünscht, daß die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde*

- i) ☒ die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung aufnimmt.
- ii) ☐ die Änderungen nach Artikel 34
- ☐ der Beschreibung (Änderungen liegen bei)
- ☐ der Ansprüche (Änderungen liegen bei)
- ☐ der Zeichnungen (Änderungen liegen bei)
- berücksichtigt.
- iii) ☐ die beim Internationalen Büro eingereichten Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 berücksichtigt (Kopie liegt bei).
- iv) ☐ die Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 nicht berücksichtigt, sondern als überholt ansieht.
- v) ☐ den Beginn der internationalen vorläufigen Prüfung bis zum Ablauf von 20 Monaten ab dem Prioritätsdatum aufschiebt, sofern die Behörde nicht eine Kopie nach Artikel 19 vorgenommener Änderungen oder eine Erklärung des Anmelders erhält, daß er keine solchen Änderungen vornehmen will (Regel 69.1 d)). *(Dieses Kästchen darf nur angekreuzt werden, wenn die Frist nach Artikel 19 noch nicht abgelaufen ist.)*

* Wenn kein Kästchen angekreuzt wird, wird mit der internationalen vorläufigen Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung begonnen; wenn eine Kopie der Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 und/oder Änderungen der internationalen Anmeldung nach Artikel 34 bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde eingeht, bevor diese mit der Erstellung eines schriftlichen Bescheids oder des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts begonnen hat, wird jedoch die geänderte Fassung verwendet.

Feld Nr. V BENENNUNG VON STAATEN ALS AUSGEWÄHLTE STAATEN

- ☒ Der Anmelder benennt als ausgewählte Staaten alle auswählbaren Staaten *(das heißt, alle Staaten, die bestimmt wurden und durch Kapitel II des PCT gebunden sind)* ausgenommen
-
-
- (Möchte der Anmelder bestimmte Staaten nicht auswählen, sind die Namen oder Zweibuchstaben-Codes dieser Staaten auf den obenstehenden Zeilen anzugeben.)*

Feld Nr. VI KONTROLLISTE

Dem Antrag liegen folgende Unterlagen für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung bei:

- | | | |
|---|---|---------|
| 1. Änderungen nach Artikel 34 | | |
| Beschreibung | : | Blätter |
| Ansprüche | : | Blätter |
| Zeichnungen | : | Blätter |
| 2. Begleitschreiben zu den Änderungen nach Artikel 34 | : | Blätter |
| 3. Kopie der Änderungen nach Artikel 19 | : | Blätter |
| 4. Kopie einer Erklärung nach Artikel 19 | : | Blätter |
| 5. Sonstige (einzeln aufführen): | : | Blätter |

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

erhalten nicht erhalten

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Dem Antrag liegen außerdem die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

- | | |
|--|---|
| 1. <input type="checkbox"/> unterzeichnete gesonderte Vollmacht | 4. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung |
| 2. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht | 5. <input type="checkbox"/> sonstige (einzeln aufführen): |
| 3. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen der Unterschrift | |

Feld Nr. VII UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS, ANWALTS ODER GEMEINSAMEN VERTRETERS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

Dr. Oliver Hertz
Patentanwalt

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

- | | |
|--|---|
| 1. Datum des tatsächlichen Eingangs des ANTRAGS: | |
| 2. Geändertes Eingangsdatum des Antrags aufgrund von BERICHTIGUNGEN nach Regel 60.1.b): | |
| 3. <input type="checkbox"/> Eingangsdatum des Antrags NACH Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum; Punkt 4 und Punkt 5, unten, finden keine Anwendung. | <input type="checkbox"/> Der Anmelder wurde entsprechend unterrichtet |
| 4. <input type="checkbox"/> Eingangsdatum des Antrags INNERHALB 19 Monate ab Prioritätsdatum wegen Fristverlängerung nach Regel 80.5. | |
| 5. <input type="checkbox"/> Das Eingangsdatum des Antrags liegt nach Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum, der verspätete Eingang ist aber nach Regel 82 ENTSCHULDIGT. | |

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Antrag vom IPEA erhalten am:

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 14692/PCT Ri	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/09781	International filing date (day/month/year) 10 December 1999 (10.12.99)	Priority date (day/month/year) 14 December 1998 (14.12.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/483		
Applicant EVOTEC BIOSYSTEMS AG		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>8</u> sheets, including this cover sheet. <input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of <u>2</u> sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 31 May 2000 (31.05.00)	Date of completion of this report 05 April 2001 (05.04.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/09781

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☒ the international application as originally filed.
- ☐ the description, pages 1-6, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. 2-16,18-22,24,25, filed with the demand,
 Nos. 1,17,23,26, filed with the letter of 09 March 2001 (09.03.2001),
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the drawings, sheets/fig 1/6-6/6, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: Box IV.3

The application relates *a priori* to two different inventions which, for the reasons given below, have no technical relationship.

The different inventions are as follows:

- a) the method according to Claim 1, comprising the special technical feature defined in the characterising part of the claim whereby cell tests are carried out on the cell traces;
- b) the method according to Claim 23, comprising the special technical feature defined in the characterising part of the claim whereby cells of the same type or of a different type are cultivated on the cell traces.

Since the **common features** of independent Claims 1 and 23 (namely those defined in the preambles) are already known from FR-A-2 743 421, and since the special technical features (PCT Rule 13.2) of Claims 1 and 23 (see a) and b) above) and also the technical problems which they address are different, there is no technical relationship between the subjects of Claims 1 and 23. The application therefore fails to meet the requirement of unity of invention (PCT Rule 13.1).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/09781

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-16, 18-24, 26	YES
	Claims	42-47 , 25 50	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-16, 23, 24, 26	YES
	Claims	42-47 17-22, 25 50	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-26	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

This report makes reference to the following document:

D1: FR-A-2 743 421 (AETSRN), 11 July 1997 (1997-07-11)

This international preliminary examination report has been established in the light of the objections relating to clarity outlined in Box VIII below.

Novelty (PCT Article 33(2))**1. Independent Claims 1, 23 and 26**

1.1 Claims 1, 23 and 26 proceed from the prior art according to document D1 (FR-A-2 743 421) and differ therefrom in the following ways:

- (i) according to **Claim 1**, the cell traces consist of material residues separated from the cells, and cell tests are carried out on the cell traces;
- (ii) according to **Claim 23**, the cell traces consist of material residues separated from the cells, and cells of the same type or of a different type are cultivated on the cell traces;
- (iii) according to **Claim 26**, the cell traces consist of material residues separated from the cells and containing genetic material from the cells, the

genetic material is amplified, and the amplified genetic material is subjected to genetic analysis.

Since these features are not found either in D1 or in any of the other documents cited in the search report, the subject matter of Claims 1, 23 and 26 is novel and meets the requirement of PCT Article 33(2).

1.2 Independent Claims 17 and 25

Claim 17:

Document D1, which is taken as the point of departure for Claim 17, discloses a device with all the features defined in the preamble of Claim 17 (see, for example, page 4, line 36 - page 5, line 19 of D1). The characterising feature of the claim relates **very generally** to the creation of particular surface regions to which material residues separated from the cells are to be attached, although **neither the cell type nor the residues as such are defined**. The microtexturing or modification of the substrate surface mentioned on page 7 of the description (involving, for example, the application of layers of a substance such as **fibronectin** that increases cell contact) are generally known in the art as ways of causing the adhesion of biological materials (cells and cell residues). Such a measure is also disclosed in D1 (see page 4, line 35 - page 5, line 20). Thus Claim 17 fails to meet the requirement of novelty (PCT Article 33(2)).

Claim 25:

Claim 25 relates to the use of material residues in order (for example) to make the surfaces of implant

materials biocompatible. Since the claim relates **very generally** to the use of material residues (i.e. not necessarily to material residues in the form of traces on substrates), it can be interpreted as referring to the use of surface proteins for this purpose, which is well known in the art. Thus Claim 25 also fails to meet the requirement of novelty (PCT Article 33(2)).

2. **Inventive step (PCT Article 33(3))**

The subject matter of Claims 1, 23 and 26 is considered to involve an inventive step (PCT Article 33(3)) because neither D1 nor any of the other documents cited in the search report suggests a method wherein cell tests, cultivations and analyses are carried out on cell residues in the form of traces. The prior art describes tests using either the cells themselves or just traces thereof.

2.1 The novelty, inventiveness and industrial applicability of the subject matter of Claims 2-16 and 24 are established by their dependency from Claims 1 and 23.

2.2 Claims 18-22 do not define any additional features involving an inventive step. These claims relate either to cell treatment and testing techniques which are known in the relevant technical field (as indicated in the second paragraph on page 3 of the application) or to method or design options which a person skilled in the art would apply as necessary in order to solve the problem at hand. Claims 18-22 therefore fail to meet the requirements of PCT Article 33(3).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/09781

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not cite document D1 or indicate the relevant prior art disclosed therein.

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

Clarity of the claims (PCT Article 6)

The subject matter of Claim 1 is not clearly defined. According to Claim 1, cell tests are carried out on the cell traces. It is not made clear that the **cell tests** (evidently using donor cells) are carried out on **material residues** that have been separated from the cells (see also the description, page 9, second paragraph).

Moreover, the preamble and the characterising part of Claim 1 do not belong together. The features of the characterising part relate to the **testing** of material residues that have been separated from the cells, while the preamble is directed to **cell manipulation**, which further detracts from the clarity of the claim.

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) 14692/PCT Ri

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Verfahren und Vorrichtung zur zellspurbasierten Zelluntersuchung und Zellkultivierung

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

EVOTEC BioSystems AG
Schnackenburgallee 114
D-22525 Hamburg (DE)

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☒

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Fuhr, Günter
Kavalierstraße 15
D-13187 Berlin (DE)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☐

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als:

☒

Anwalt

☐

gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Hertz, Oliver
v. B zold & Sozien
Akademiestraße 7
D-80799 München (DE)

Telefonnr.:

089 / 38 999 80

Telefaxnr.:

089 / 38 999 850

Fernschreibnr.:

☒ Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Hagedorn, Rolf
Wartiner Straße 16
D-13057 Berlin (DE)

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
- ☒ Anmelder und Erfinder
- ☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Shirley, Stephen, Graham
Victoria Main Street
Brandon, Warwickshire CV8 3NW (GB)

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
- ☒ Anmelder und Erfinder
- ☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

GB

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

GB

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Richter, Ekkehard
Walkürenstraße 3A
D-10318 Berlin (DE)

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
- ☒ Anmelder und Erfinder
- ☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
- ☐ Anmelder und Erfinder
- ☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☐ **AP ARIPO-Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☐ **EA Eurasisches Patent:** AM Armenien, AZ Aserbaidschan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **EP Europäisches Patent:** AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☐ **OA OAPI-Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AL Albanien | <input type="checkbox"/> LT Litauen |
| <input type="checkbox"/> AM Armenien | <input type="checkbox"/> LU Luxemburg |
| <input type="checkbox"/> AT Österreich | <input type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input type="checkbox"/> AU Australien | <input type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input type="checkbox"/> AZ Aserbaidschan | <input type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input type="checkbox"/> BR Brasilien | <input type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input type="checkbox"/> CA Kanada | <input type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input type="checkbox"/> PL Polen |
| <input type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> CU Kuba | <input type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> DK Dänemark | <input type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input type="checkbox"/> EE Estland | <input type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input type="checkbox"/> ES Spanien | <input type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input type="checkbox"/> FI Finnland | <input type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GE Georgien | <input type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia | <input type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input type="checkbox"/> GW Guinea-Bissau | <input type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input type="checkbox"/> HU Ungarn | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesien | <input type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input type="checkbox"/> KE Kenia | <input type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input type="checkbox"/> YU Jugoslawien |
| <input type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | <input type="checkbox"/> ZW Simbabwe |
| <input type="checkbox"/> KR Republik Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kasachstan | |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia | |
| <input type="checkbox"/> LS Lesotho | |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der Bestimmung von

Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH		Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben. <input type="checkbox"/>																	
Die Priorität der folgenden früheren Anmeldung(en) wird hiermit beansprucht:																			
Staat (Anmelde- oder Bestimmungsstaat der Anmeldung)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Anmeldeamt (nur bei regionaler oder internationaler Anmeldung)																
(1) DE	14.12.1998	198 57 692.7																	
(2)																			
(3)																			
<p><i>Dieses Kästchen ankreuzen, wenn die beglaubigte Kopie der früheren Anmeldung von dem Amt ausgestellt werden soll, das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist (eine Gebühr kann verlangt werden):</i></p> <p><input type="checkbox"/> Das Anmeldeamt wird hiermit ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in Zeile(n) _____ bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem Internationalen Büro zu übermitteln.</p>																			
Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE																			
<p>Wahl der Internationalen Recherchenbehörde (ISA) (Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig, ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll; Zweibuchstaben-Code genügt): ISA / _____</p> <p>Frühere Recherche Auszufüllen, wenn eine Recherche (internationale Recherche, Recherche internationaler Art oder sonstige Recherche) bereits bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist und diese Behörde nun ersucht wird, die internationale Recherche soweit wie möglich auf die Ergebnisse einer solchen früheren Recherche zu stützen. Die Recherche oder der Recherchenantrag ist durch Angabe der betreffenden Anmeldung (bzw. deren Übersetzung) oder des Recherchenantrags zu bezeichnen.</p> <p>Staat (oder regionales Amt): _____ Datum (Tag/Monat/Jahr) : _____ Aktenzeichen: _____</p>																			
Feld Nr. VIII KONTROLLISTE																			
<p>Diese internationale Anmeldung umfaßt:</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;">1. Antrag : 4 Blätter</td> <td style="width: 50%;">1. <input type="checkbox"/> Unterzeichnete gesonderte Vollmacht</td> </tr> <tr> <td>2. Beschreibung : 16 Blätter</td> <td>2. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht</td> </tr> <tr> <td>3. Ansprüche : 4 Blätter</td> <td>3. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen der Unterschrift</td> </tr> <tr> <td>4. Zusammenfassung : 1 Blätter</td> <td>4. <input type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e) (durch die Zeilennummer von Feld Nr. VI kennzeichnen):</td> </tr> <tr> <td>5. Zeichnungen : 6 Blätter</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Insgesamt : 31 Blätter</td> <td></td> </tr> </table>		1. Antrag : 4 Blätter	1. <input type="checkbox"/> Unterzeichnete gesonderte Vollmacht	2. Beschreibung : 16 Blätter	2. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht	3. Ansprüche : 4 Blätter	3. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen der Unterschrift	4. Zusammenfassung : 1 Blätter	4. <input type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e) (durch die Zeilennummer von Feld Nr. VI kennzeichnen):	5. Zeichnungen : 6 Blätter		Insgesamt : 31 Blätter		<p>Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;">5. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung</td> <td style="width: 50%;">6. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen</td> </tr> <tr> <td>7. <input type="checkbox"/> Sequenzprotokolle für Nucleotide und/oder Aminosäuren (Diskette)</td> <td>8. <input type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auflisten):</td> </tr> </table>		5. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung	6. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen	7. <input type="checkbox"/> Sequenzprotokolle für Nucleotide und/oder Aminosäuren (Diskette)	8. <input type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auflisten):
1. Antrag : 4 Blätter	1. <input type="checkbox"/> Unterzeichnete gesonderte Vollmacht																		
2. Beschreibung : 16 Blätter	2. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht																		
3. Ansprüche : 4 Blätter	3. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen der Unterschrift																		
4. Zusammenfassung : 1 Blätter	4. <input type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e) (durch die Zeilennummer von Feld Nr. VI kennzeichnen):																		
5. Zeichnungen : 6 Blätter																			
Insgesamt : 31 Blätter																			
5. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung	6. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen																		
7. <input type="checkbox"/> Sequenzprotokolle für Nucleotide und/oder Aminosäuren (Diskette)	8. <input type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auflisten):																		
Abbildung Nr. 1 der Zeichnungen (falls vorhanden) soll mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden.																			
Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS																			
<p><i>Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.</i></p> <p>Hertz, Oliver Europäischer Patentanwalt</p>																			

Vom Anmeldeamt auszufüllen	
<p>1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:</p> <p>3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:</p> <p>4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:</p>	<p>2. Zeichnungen</p> <p><input type="checkbox"/> eingegangen:</p> <p><input type="checkbox"/> nicht eingegangen:</p>
<p>5. Vom Anmelder benannte Internationale Recherchenbehörde: ISA / _____</p>	<p>6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben</p>

Vom Internationalen Büro auszufüllen
<p>Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:</p>

/ 9. Feb. 2001

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

PCT

SCHRIFTLICHER BESCHEID
(Regel 66 PCT)

An:

Hertz, Oliver
VON BEZOLD & SOZIEN
Akademiestrasse 7
D-80799 München
ALLEMAGNE

VERGANGEN
10. Nov. 2000
v. Bezold & Sozien

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr) 09.11.2000

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
14692/PCT Ri

ANTWORT FÄLLIG innerhalb von **3 Monat(en)**
ab obigem Absendedatum

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/09781	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 10/12/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 14/12/1998
--	---	--

Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK
G01N33/483

Anmelder
EVOTEC BIOSYSTEMS AG et al.

- Dieser Bescheid ist der **erste** schriftliche Bescheid der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde
- Dieser Bescheid enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Bescheides
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

- Der Anmelder wird **aufgefordert**, zu diesem Bescheid **Stellung zu nehmen**



Wann? Siehe oben genannte Frist. Der Anmelder kann vor Ablauf dieser Frist bei der Behörde eine Verlängerung beantragen, siehe Regel 66.2 d).

Wie? Durch Einreichung einer schriftlichen Stellungnahme und gegebenenfalls von Änderungen nach Regel 66.3. Zu Form und Sprache der Änderungen, siehe Regeln 66.8 und 66.9.

Dazu: Hinsichtlich einer zusätzlichen Möglichkeit zur Einreichung von Änderungen, siehe Regel 66.4. Hinsichtlich der Verpflichtung des Prüfers, Änderungen und/oder Gegenvorstellungen zu berücksichtigen, siehe Regel 66.4 bis. Hinsichtlich einer formlosen Erörterung mit dem Prüfer, siehe Regel 66.6.

Wird keine Stellungnahme eingereicht, so wird der internationale vorläufige Prüfungsbericht auf der Grundlage dieses Bescheides erstellt.

- Der Tag, an dem der internationale vorläufige Prüfungsbericht gemäß Regel 69.2 spätestens erstellt sein muß, ist der: 14/04/2001.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragte Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter / Prüfer Van der Goot, D Formalsachbearbeiter (einschl. Fristverlängerung) Conner, M Tel. +49 89 2399 2241	
---	--	---

I. Grundlage des Bescheids

1. Dieser Bescheid wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Bescheids als "ursprünglich eingereicht".*):

Beschreibung, Seiten:

1-16 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-25 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/6-6/6 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

3. Dieser Bescheid ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ansprüche	1,2,7,13-15,17,18,25
Erfinderische Tätigkeit (IS)	Ansprüche	3-6,9-12,19-22
Gewerbliche Anwendbarkeit (IA)	Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen:

siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

Es wird auf das folgende Dokument verwiesen:

D1: FR-A-2 743 421 (AETSRN) 11. Juli 1997 (1997-07-11)

Abschnitt V

Neuheit (Art. 33(2), PCT).

1. Unabhängige Ansprüche 1, 17, 25.

- 1.1 In so fern Anspruch 1 derzeit verstanden werden kann (siehe auch Abschnitt VIII) fehlt ihm aus folgenden Gründen die Neuheit.

Dokument D1, das als nächstliegender Stand der Technik gegenüber dem Gegenstand des Anspruchs 1 angesehen wird, offenbart (die Verweise in Klammern beziehen sich auf dieses Dokument) ein:

Verfahren zur zellspurbasierten Untersuchung biologischer Zellen, bei dem die Zellen auf ein zumindest teilweise strukturiertes und/oder oberflächenmodifiziertes Substrat aufgebracht werden (S.1, Z. 2-7 ; S. 2, Z. 11-15 und S. 4, Z. 35 bis S. 5, Z. 19) und sich adhärent über Bahn-Oberflächenbereiche des Substrats unter Erzeugung von Zellspuren bewegen (Fig. 1), die aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen (S. 3, Z. 3-7 und Fig. 1) , und Zelluntersuchungen an den **Zellspuren** durchgeführt werden (S. 4, Z. 6-9).

Die **breiten** Begriffe "von den Zellen abgetrennten Materialrückstände" und "Zellenuntersuchungen and den Zellspuren" in Anspruch 1, umfassen die Materialrückstände aus denen die Spuren gemäß D1 gebildet sind (siehe z. B. D1, Seite 3, Z. 5-6), bzw. die Untersuchungen, die gemäß D1 an den **Zellspuren** durchgeführt werden (vgl. z.B. D1, Seite 4, Z. 6-9 und die Prozeduren auf Seiten 9 und 10 der vorliegenden Anmeldung).

Das bekannte Verfahren läßt sich somit auf Anspruch 1 der vorliegenden Anmeldung lesen und der Anspruch erfüllt dadurch nicht die Erfordernisse nach Art. 33(2), PCT).

- 1.2 Auch eine Vorrichtung gemäß Anspruch 17 ist aus D1 bekannt (siehe z.B. D1, Seite 4, Z. 36 bis Seite 5, Z. 19).

1.3 Zu der Verwendung von Materialrückständen, die von biologischen Zellen auf Substraten gebildet sind zur Untersuchung von Eigenschaften der Zellen für medizinische, biochemische und/oder pharmakologische Zwecke gemäß Anspruch 25, wird auf D1, Seite 3, Z. 21-26 verwiesen.

1.4 Somit erfüllen auch die Ansprüche 17 und 25 nicht die Erfordernisse nach Art. 33(2), PCT.

1.5 Abhängige Ansprüche 2, 7, 13, 14, 15 und 18

Die zusätzliche Merkmale der abhängigen Ansprüche 2, 7, 13, 14, 15 und 18 sind bereits aus D1 bekannt (siehe D1, Seite 3, Z. 27 bis Seite 4, Z. 28).

Somit erfüllen auch diese abhängigen Ansprüche nicht die Erfordernisse nach Art. 33(2), PCT.

2. Erfinderische Tätigkeit (Art. 33(3), PCT)

Die **Ansprüche 3-6, 9-12 und 19-22** scheinen keine zusätzlichen Merkmale zu enthalten, die eine erfinderische Tätigkeit beinhalten. Sie betreffen entweder, wie in der Anmeldung bereits auf Seite 3, Absatz 2 erwähnt, für den auf dem einschlägigen Gebiet tätigen Fachmann bekannte Techniken zur Zellbehandlung und Zelluntersuchung, oder beziehen sich auf Verfahrens- oder Konstruktionsoptionen, die der Fachmann den Umständen entsprechend anwenden würde um die gestellte Aufgabe zu lösen.

Somit erfüllen diese Ansprüche nicht die Erfordernisse nach Art. 33(3), PCT.

3. Bemerkungen

3.1 Anspruch 1 betrifft ein Verfahren zur **zellspurbasierten Untersuchung** während Anspruch 23 ein Verfahren zur **zellspurbasierten Kultivierung** betrifft.

Die erforderliche Einheitlichkeit der Erfindung (Regel 13.1 PCT) ist damit insofern nicht gegeben, als zwischen den Gegenständen dieser unabhängige Ansprüche kein technischer Zusammenhang im Sinne der Regel 13.2 PCT besteht, der in einem oder mehreren gleichen oder entsprechenden besonderen technischen Merkmal/en zum Ausdruck kommt.

- 3.2 Um die Prüfung von geänderten Anmeldungsunterlagen im Hinblick auf Artikel 34(2) b) PCT zu erleichtern, wird der Anmelder gebeten, die durchgeführten Änderungen, unabhängig davon, ob es sich um Änderungen durch Hinzufügen, Ersetzen oder Streichen handelt, deutlich aufzuzeigen und anzugeben, auf welche Stellen in der ursprünglich eingereichten Anmeldung sich diese Änderungen stützen (siehe auch Regel 66.8 a) PCT).

Gegebenenfalls können diese Angaben in handschriftlicher Form auf Kopien der betreffenden Teile der ursprünglichen Anmeldung erfolgen.

Abschnitt VII

1. Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in dem Dokument D1 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch dieses Dokument angegeben.
2. Die unabhängigen Ansprüche sind nicht in der zweiteiligen Form nach Regel 6.3 b) PCT abgefaßt. Im vorliegenden Fall erscheint die Zweiteilung jedoch zweckmäßig. Folglich sollten die in Verbindung miteinander aus dem Stand der Technik bekannten Merkmale (Dokument D1) im Oberbegriff zusammengefaßt (Regel 6.3 b) i) PCT) und die übrigen Merkmale im kennzeichnenden Teil aufgeführt werden (Regel 6.3 b) ii) PCT).

Abschnitt VIII

Klarheit der Ansprüche (Art. 6 PCT)

1. In Anspruch 1 ist unklar, was unter "Zelluntersuchungen an den Zellspuren" zu verstehen ist. Aus dem Anspruch geht nicht klar hervor ob es sich hier um Untersuchungen an den Spuren, oder an dem diese Spuren bildenden Material handelt.
2. Anspruch 17 läßt offen ob die Zellen und die von deren Materialrückständen gebildeten Zellspuren Teile der Vorrichtung bilden. Sollte dies nicht der Fall sein,

so ist der Anspruch unklar, weil dann die Hafteigenschaften der Bahn-Oberflächenbereichen an Hand von nicht zu der Vorrichtung gehörende Elementen definiert werden.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

FAX: 089 3899 9850

An:

Hertz, Oliver
VON BEZOLD & SOZIEN
Akademiestrasse 7
D-80799 München
ALLEMAGNE

ERIEGEGANGEN

10. April 2001

v. Bezold & Sozien

PCT

CONFIRMATION

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS

(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

5. 04. 01

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
14692/PCT Ri

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP99/09781

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
10/12/1999

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
14/12/1998

Anmelder

EVOTEC BIOSYSTEMS AG et al.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung
beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Conner, M

Tel. +49 89 2399-2241



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 14692/PCT Ri	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/09781	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 10/12/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 14/12/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N33/483		
Anmelder EVOTEC BIOSYSTEMS AG et al.		



1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 31/05/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 13.06.01
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Van der Goot, D Tel. Nr. +49 89 2399 2562 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-16 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

2-16,18-22,24, ursprüngliche Fassung
25

1,17,23,26 eingegangen am 09/03/2001 mit Schreiben vom 09/03/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/6-6/6 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen

Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:

- ☐ die Ansprüche eingeschränkt.
- ☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.
- ☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
- ☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.

2. ☒ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.

3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3

- ☐ erfüllt ist
- ☒ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:
siehe Beiblatt

4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:

- ☒ alle Teile.
- ☐ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-16, 18-24, 26
	Nein: Ansprüche	17,25
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-16,23,24,26
	Nein: Ansprüche	17-22, 25
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-26
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt**

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
si he Beiblatt

Es wird auf das folgende Dokument verwiesen:

D1: FR-A-2 743 421 (AETSRN) 11. Juli 1997 (1997-07-11)

Abschnitt IV

Die Anmeldung enthält a priori zwei verschiedene Erfindungen, zwischen denen aus folgenden Gründen kein technischer Zusammenhang besteht.

Die verschiedenen Erfindungen sind:

- a) Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei gemäß dem zweiten Teil des Anspruchs als besonderes technisches Merkmal, an den Zellspuren Zelluntersuchungen durchgeführt werden; und
- b) Das Verfahren gemäß Anspruch 23, wobei gemäß dem zweiten Teil des Anspruchs auf den Zellspuren eine Kultivierung von Zellen gleichen oder andersartigen Typs durchgeführt wird.

Weil **die gemeinsamen Merkmale** der unabhängigen Ansprüche 1 und 23, nämlich die in den Oberbegriffen dieser Ansprüche definierten Merkmale bereits aus D1 bekannt sind, und die besonderen technischen Merkmalen (siehe Regel 13(2) PCT) der Ansprüche 1 und 23 (siehe a) und b) oben) wie auch die diesen Merkmalen zugrunde liegenden Aufgaben unterschiedlich sind, fehlt der technische Zusammenhang zwischen den Gegenständen der Ansprüche 1 und 23. Das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung, wie im Regel 13(1) PCT angegeben, ist daher nicht erfüllt.

Abschnitt V

Unter Berücksichtigung der Klarheitseinwände unter Abschnitt VIII dieses Berichts, wird der folgende internationale vorläufige Prüfungsbericht erstellt:

Neuheit (Art. 33(2), PCT).

1. Unabhängige Ansprüche 1, 23 und 26.

- 1.1 Die Ansprüche 1, 23 und 26 gehen von dem Stand der Technik nach D1

(FR-A-2743421) aus und unterscheiden sich von diesem Stand der Technik dadurch, daß:

- i) gemäß **Anspruch 1** die Zellspuren aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen und an den Zellspuren Zelluntersuchungen durchgeführt werden;
- ii) gemäß **Anspruch 23** die Zellspuren aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen und auf den Zellspuren eine Kultivierung von Zellen gleichen oder andersartigen Typs durchgeführt wird; und
- iii) gemäß **Anspruch 26** die Zellspuren aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen, die genetische Materialien der Zellen enthalten, und die genetischen Materialien einer Amplifizierung und das amplifizierte genetische Material einer genetischen Analyse unterzogen wird.

Da auch keine der weiteren im Recherchenbericht genannten Druckschriften diese Merkmale zeigen, sind die Gegenstände der Ansprüche 1, 23 und 26 neu und erfüllen somit das in Artikel 33(2) PCT genannte Kriterium.

1.2 Unabhängige Ansprüche 17 und 25

Anspruch 17.

Die als Ausgangspunkt für den Anspruch 17 genommene Druckschrift D1 offenbart eine Vorrichtung mit allen Merkmalen gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 17 (siehe z.B. D1, Seite 4, Z. 36 bis Seite 5, Z. 19). Das kennzeichnende Merkmal des Anspruchs betrifft **ganz allgemein** die Einrichtung bestimmter Oberflächenbereiche zur Anhaftung von aus Zellen abgetrennten Materialrückständen, **wobei weder die Art der Zellen, noch die Rückstände als solchen definiert sind**. Die in der Anmeldung auf Seite 7 erwähnten Mikrostrukturierung bzw. Modifizierung der Substratoberfläche (z.B. das Aufbringen von Zellkontakt erhöhenden Schichten, wie **Fibronectin**) sind für den Fachmann allgemein bekannte Maßnahmen zur Anhaftung von biologischen Materialien (Zellen und Zellenrückstände). Auch die Druckschrift D1 offenbart eine solche Maßnahme (siehe Seite 4, Zeile 35 bis Seite 5, Zeile 20). Somit fehlt dem Anspruch 17 die nach Artikel 33(2) erforderliche Neuheit.

Anspruch 25.

Der Anspruch 25 betrifft die Verwendung von Materialrückständen, zur z.B.

biokompatiblen Modifizierung der Oberflächen von Implantatmaterialien. Weil der Anspruch **ganz allgemein** auf die Verwendung von Materialrückständen abgestimmt ist (also nicht unbedingt die Materialrückstände, die in Form von Spuren auf Substraten gebildet sind), läßt der Anspruch sich lesen auf die dem Fachmann für diesen Zweck durchaus bekannte Verwendung von Oberflächenproteinen.

Somit fehlt auch dem Anspruch 17 die nach Artikel 33(2) erforderliche Neuheit.

2. Erfinderische Tätigkeit (Art. 33(3) PCT)

Die Gegenstände der Ansprüche 1, 23 und 26 werden als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet (Art. 33(3), PCT), da weder die Druckschrift D1, noch die anderen recherchierten Druckschriften ohne weiteres ein Verfahren zu entnehmen ist, wobei Zelluntersuchungen, Kultivierung und Analysen an bzw. auf den/die von den Zellen in Spuren gebildeten Zellenrückstände(n) durchgeführt werden. Es werden im Stand der Technik entweder die Zellen selbst oder nur die Spuren untersucht.

2.1 Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit der Gegenstände der Ansprüche 2-16 und 24 ergeben sich aus der Abhängigkeit dieser Ansprüche von Anspruch 1 bzw. Anspruch 23.

2.2 Die **Ansprüche 18-22** enthalten keine zusätzlichen Merkmale, die eine erfinderische Tätigkeit beinhalten. Sie betreffen entweder, wie in der Anmeldung bereits auf Seite 3, Absatz 2 erwähnt, für den auf dem einschlägigen Gebiet tätigen Fachmann bekannte Techniken zur Zellbehandlung und Zelluntersuchung, oder beziehen sich auf Verfahrens- oder Konstruktions- Optionen, die der Fachmann den Umständen entsprechend anwenden würde um die gestellte Aufgabe zu lösen.

Somit erfüllen diese Ansprüche nicht die Erfordernisse nach Art. 33(3), PCT.

Abschnitt VII

1. Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in dem Dokument D1 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch dieses Dokument angegeben.

Abschnitt VIII

Klarheit der Ansprüche (Art. 6 PCT)

1. Der Gegenstand des Anspruchs 1 ist nicht klar definiert. Gemäß Anspruch 1 werden an den Zellspuren **Zelluntersuchungen** durchgeführt. Hieraus geht nicht klar hervor, daß die Zelluntersuchungen (offenbar die von den Spenderzellen) an Hand von Untersuchungen an den von den Zellen abgetrennten **Materialrückständen** durchgeführt werden (siehe auch die Beschreibung auf Seite 9, Absatz 2).
Zudem passen Oberbegriff und Kennzeichen des Anspruchs nicht zusammen. Obwohl die Merkmale im Kennzeichen des Anspruchs 1 die **Untersuchung** an von den Zellen abgetrennten Materialrückständen betrifft, ist der Oberbegriff des Anspruchs 1 auf eine **Manipulierung der Zellen** abgestimmt, was zu einer weiteren Unklarheit des Anspruchs führt.

14692/PCT Hz

9. März 2001

Patentansprüche 1, 17, 23 und 26

1. Verfahren zur Manipulierung biologischer Zellen, bei dem die Zellen (16, 76a, 76b) auf ein zumindest teilweise strukturiertes und/oder oberflächenmodifiziertes Substrat (11, 31, 41, 51, 61, 71) aufgebracht werden und sich adhärent über Bahn-Oberflächenbereiche (13, 15, 17, 35, 45, 55, 57, 77a, 77b) des Substrats unter Erzeugung von Zellspuren (14a, 14b, 34, 44) bewegen,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Zellspuren (14a, 14b, 34, 44) aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen und an den Zellspuren Zelluntersuchungen durchgeführt werden.

17. Vorrichtung zur Manipulierung biologischer Zellen (16, 76a, 76b) mit einem Substrat (11, 31, 41, 51, 61, 71) mit Oberflächenbereichen (12, 52, 72), an denen die Zellen schlechter adhärrieren als auf Bahn-Oberflächenbereichen (13, 15, 17, 35, 45, 55, 57, 77a, 77b), in denen die Zellen gut anhaften und sich adhärent bewegen können,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Bahn-Oberflächenbereiche zur Anhaftung von Zellspuren (14a, 14b, 34, 44) aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen eingerichtet sind.

23. Verfahren zur Manipulierung biologischer Zellen, bei dem die Zellen (16) auf ein zumindest teilweise strukturiertes und/oder oberflächenmodifiziertes Substrat (11) aufgebracht werden und sich adhärent über die Oberfläche des Substrats unter Erzeugung von Zellspuren (14a, 14b) bewegen,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Zellspuren (14a, 14b) aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen und auf den Zellspuren eine Kulti-

vierung von Zellen gleichen oder andersartigen Typs durchgeführt wird.

26. Verfahren zur Manipulierung biologischer Zellen, bei dem die Zellen (16, 76a, 76b) auf ein zumindest teilweise strukturiertes und/oder oberflächenmodifiziertes Substrat (11, 31, 41, 51, 61, 71) aufgebracht werden und sich adhärent über Bahn-Oberflächenbereiche (13, 15, 17, 35, 45, 55, 57, 77a, 77b) des Substrats unter Erzeugung von Zellspuren (14b) bewegen,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Zellspuren (14b) aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen, die genetische Materialien der Zellen enthalten, und die genetischen Materialien einer Amplifizierung und das amplifizierte genetische Material einer genetischen Analyse unterzogen werden.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 05 APR 2001

WIPO

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 14692/PCT Ri	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/09781	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 10/12/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 14/12/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N33/483		
Anmelder EVOTEC BIOSYSTEMS AG et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 31/05/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 5. 04. 01
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Van der Goot, D Tel. Nr. +49 89 2399 2562 

Formblatt PCT/IPEA/409 (Deckblatt) (Januar 1994)

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**Internationales Aktenzeichen **PCT/EP99/09781****I. Grundlage des Berichts**

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17):* Beschreibung, Seiten:

1-16 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

2-16, 18-22, 24, ursprüngliche Fassung
25

1, 17, 23, 26 eingegangen am 09/03/2001 mit Schreiben vom 09/03/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/6-6/6 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**Internationales Aktenzeichen **PCT/EP99/09781**

Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:

- ☐ die Ansprüche eingeschränkt.
- ☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.
- ☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
- ☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.

2. ☒ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.

3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3

- ☐ erfüllt ist
- ☒ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:
siehe Beiblatt

Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:

alle Teile.

Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**Internationales Aktenzeichen **PCT/EP99/09781****V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung****1. Feststellung**

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-16, 18-24, 26
	Nein: Ansprüche	17,25
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-16,23,24,26
	Nein: Ansprüche	17-22, 25
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-26
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt****VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung**

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/09781

Es wird auf das folgende Dokument verwiesen:

D1: FR-A-2 743 421 (AETSRN) 11. Juli 1997 (1997-07-11)

Abschnitt IV

Die Anmeldung enthält a priori zwei verschiedene Erfindungen, zwischen denen aus folgenden Gründen kein technischer Zusammenhang besteht.

Die verschiedenen Erfindungen sind:

- a) Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei gemäß dem zweiten Teil des Anspruchs als besonderes technisches Merkmal, an den Zellspuren Zelluntersuchungen durchgeführt werden; und
- b) Das Verfahren gemäß Anspruch 23, wobei gemäß dem zweiten Teil des Anspruchs auf den Zellspuren eine Kultivierung von Zellen gleichen oder andersartigen Typs durchgeführt wird.

Weil die gemeinsamen Merkmale der unabhängigen Ansprüche 1 und 23, nämlich die in den Oberbegriffen dieser Ansprüche definierten Merkmale bereits aus D1 bekannt sind, und die besonderen technischen Merkmalen (siehe Regel 13(2) PCT) der Ansprüche 1 und 23 (siehe a) und b) oben) wie auch die diesen Merkmalen zugrunde liegenden Aufgaben unterschiedlich sind, fehlt der technische Zusammenhang zwischen den Gegenständen der Ansprüche 1 und 23. Das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung, wie im Regel 13(1) PCT angegeben, ist daher nicht erfüllt.

Abschnitt V

Unter Berücksichtigung der Klarheitseinwände unter Abschnitt VIII dieses Berichts, wird der folgende internationale vorläufige Prüfungsbericht erstellt:

Neuheit (Art. 33(2), PCT).**1. Unabhängige Ansprüche 1, 23 und 26.**

- 1.1 Die Ansprüche 1, 23 und 26 gehen von dem Stand der Technik nach D1

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/09781

(FR-A-2743421) aus und unterscheiden sich von diesem Stand der Technik dadurch, daß:

- i) gemäß **Anspruch 1** die Zellspuren aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen und an den Zellspuren Zelluntersuchungen durchgeführt werden;
- ii) gemäß **Anspruch 23** die Zellspuren aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen und auf den Zellspuren eine Kultivierung von Zellen gleichen oder andersartigen Typs durchgeführt wird; und
- iii) gemäß **Anspruch 26** die Zellspuren aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen, die genetische Materialien der Zellen enthalten, und die genetischen Materialien einer Amplifizierung und das amplifizierte genetische Material einer genetischen Analyse unterzogen wird.

Da auch keine der weiteren im Recherchenbericht genannten Druckschriften diese Merkmale zeigen, sind die Gegenstände der Ansprüche 1, 23 und 26 neu und erfüllen somit das in Artikel 33(2) PCT genannte Kriterium.

1.2 Unabhängige Ansprüche 17 und 25

Anspruch 17.

Die als Ausgangspunkt für den Anspruch 17 genommene Druckschrift D1 offenbart eine Vorrichtung mit allen Merkmalen gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 17 (siehe z.B. D1, Seite 4, Z. 36 bis Seite 5, Z. 19). Das kennzeichnende Merkmal des Anspruchs betrifft **ganz allgemein** die Einrichtung bestimmter Oberflächenbereiche zur Anhaftung von aus Zellen abgetrennten Materialrückständen, **wobei weder die Art der Zellen, noch die Rückstände als solchen definiert sind**. Die in der Anmeldung auf Seite 7 erwähnten Mikrostrukturierung bzw. Modifizierung der Substratoberfläche (z.B. das Aufbringen von Zellkontakt erhöhenden Schichten, wie **Fibronectin**) sind für den Fachmann allgemein bekannte Maßnahmen zur Anhaftung von biologischen Materialien (Zellen und Zellenrückstände). Auch die Druckschrift D1 offenbart eine solche Maßnahme (siehe Seite 4, Zeile 35 bis Seite 5, Zeile 20). Somit fehlt dem Anspruch 17 die nach Artikel 33(2) erforderliche Neuheit.

Anspruch 25.

Der Anspruch 25 betrifft die Verwendung von Materialrückständen, zur z.B.

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/09781

biokompatiblen Modifizierung der Oberflächen von Implantatmaterialien. Weil der Anspruch **ganz allgemein** auf die Verwendung von Materialrückständen abgestimmt ist (also nicht unbedingt die Materialrückstände, die in Form von Spuren auf Substraten gebildet sind), läßt der Anspruch sich lesen auf die dem Fachmann für diesen Zweck durchaus bekannte Verwendung von Oberflächenproteinen.

Somit fehlt auch dem Anspruch 17 die nach Artikel 33(2) erforderliche Neuheit.

2. Erfinderische Tätigkeit (Art. 33(3) PCT)

Die Gegenstände der Ansprüche 1, 23 und 26 werden als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet (Art. 33(3), PCT), da weder die Druckschrift D1, noch die anderen recherchierten Druckschriften ohne weiteres ein Verfahren zu entnehmen ist, wobei Zelluntersuchungen, Kultivierung und Analysen an bzw. auf den/die von den Zellen in Spuren gebildeten Zellenrückstände(n) durchgeführt werden. Es werden im Stand der Technik entweder die Zellen selbst oder nur die Spuren untersucht.

2.1 Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit der Gegenstände der Ansprüche 2-16 und 24 ergeben sich aus der Abhängigkeit dieser Ansprüche von Anspruch 1 bzw. Anspruch 23.

2.2 Die **Ansprüche 18-22** enthalten keine zusätzlichen Merkmale, die eine erfinderische Tätigkeit beinhalten. Sie betreffen entweder, wie in der Anmeldung bereits auf Seite 3, Absatz 2 erwähnt, für den auf dem einschlägigen Gebiet tätigen Fachmann bekannte Techniken zur Zellbehandlung und Zelluntersuchung, oder beziehen sich auf Verfahrens- oder Konstruktions- Optionen, die der Fachmann den Umständen entsprechend anwenden würde um die gestellte Aufgabe zu lösen.

Somit erfüllen diese Ansprüche nicht die Erfordernisse nach Art. 33(3), PCT.

Abschnitt VII

1. Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in dem Dokument D1 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch dieses Dokument angegeben.

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/09781

Abschnitt VIII**Klarheit der Ansprüche (Art. 6 PCT)**

1. Der Gegenstand des Anspruchs 1 ist nicht klar definiert. Gemäß Anspruch 1 werden an den Zellspuren **Zelluntersuchungen** durchgeführt. Hieraus geht nicht klar hervor, daß die Zelluntersuchungen (offenbar die von den Spenderzellen) an Hand von Untersuchungen an den von den Zellen abgetrennten **Materialrückständen** durchgeführt werden (siehe auch die Beschreibung auf Seite 9, Absatz 2).
Zudem passen Oberbegriff und Kennzeichen des Anspruchs nicht zusammen. Obwohl die Merkmale im Kennzeichen des Anspruchs 1 die **Untersuchung** an von den Zellen abgetrennten Materialrückständen betrifft, ist der Oberbegriff des Anspruchs 1 auf eine **Manipulierung der Zellen** abgestimmt, was zu einer weiteren Unklarheit des Anspruchs führt.

14692/PCT Hz

9. März 2001

Patentansprüche 1, 17, 23 und 26

1. Verfahren zur Manipulierung biologischer Zellen, bei dem die Zellen (16, 76a, 76b) auf ein zumindest teilweise strukturiertes und/oder oberflächenmodifiziertes Substrat (11, 31, 41, 51, 61, 71) aufgebracht werden und sich adhärent über Bahn-Oberflächenbereiche (13, 15, 17, 35, 45, 55, 57, 77a, 77b) des Substrats unter Erzeugung von Zellspuren (14a, 14b, 34, 44) bewegen,

dadurch gekennzeichnet, dass
die Zellspuren (14a, 14b, 34, 44) aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen und an den Zellspuren Zelluntersuchungen durchgeführt werden.

17. Vorrichtung zur Manipulierung biologischer Zellen (16, 76a, 76b) mit einem Substrat (11, 31, 41, 51, 61, 71) mit Oberflächenbereichen (12, 52, 72), an denen die Zellen schlechter adhären als auf Bahn-Oberflächenbereichen (13, 15, 17, 35, 45, 55, 57, 77a, 77b), in denen die Zellen gut anhaften und sich adhärent bewegen können,

dadurch gekennzeichnet, dass
die Bahn-Oberflächenbereiche zur Anhaftung von Zellspuren (14a, 14b, 34, 44) aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen eingerichtet sind.

23. Verfahren zur Manipulierung biologischer Zellen, bei dem die Zellen (16) auf ein zumindest teilweise strukturiertes und/oder oberflächenmodifiziertes Substrat (11) aufgebracht werden und sich adhärent über die Oberfläche des Substrats unter Erzeugung von Zellspuren (14a, 14b) bewegen,

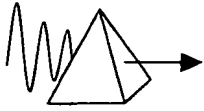
dadurch gekennzeichnet, dass
die Zellspuren (14a, 14b) aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen und auf den Zellspuren eine Kulti-

GEAENDERTES BLATT

vierung von Zellen gleichen oder andersartigen Typs durchgeführt wird.

26. Verfahren zur Manipulierung biologischer Zellen, bei dem die Zellen (16, 76a, 76b) auf ein zumindest teilweise strukturiertes und/oder oberflächenmodifiziertes Substrat (11, 31, 41, 51, 61, 71) aufgebracht werden und sich adhärent über Bahn-Oberflächenbereiche (13, 15, 17, 35, 45, 55, 57, 77a, 77b) des Substrats unter Erzeugung von Zellspuren (14b) bewegen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellspuren (14b) aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen, die genetische Materialien der Zellen enthalten, und die genetischen Materialien einer Amplifizierung und das amplifizierte genetische Material einer genetischen Analyse unterzogen werden.

GEAENDERTES BLATT



v. Bezold & Sozien
Patentanwälte

v. Bezold & Sozien · Akademiestr. 7 · D-80799 München

Europäisches Patentamt
Erhardtstraße 27
D-80298 München



Dieter v. Bezold
Dr. rer. nat.
Peter Schütz
Dipl.-Ing.
Wolfgang Heusler
Dipl.-Ing.
Oliver Hertz
Dr. rer. nat., Dipl.-Phys.
Jutta Draudt
Dr. rer. nat., Dipl.-Chem.
Patentanwälte
European Patent and
Trademark Attorneys

Akademiestr. 7
D-80799 München
Tel.: +49-89-38 999 80
Fax: +49-89-38 999 850
eMail: info@sombez.com

9. März 2001

Aktenzeichen: PCT/EP99/09781
Anmelder: EVOTEC BIOSYSTEMS AG et al
Unser Zeichen: 14692/PCT Hz/hr

Auf die Mitteilung vom 9. November 2000:

Hiermit werden neue Patentansprüche 1, 17 und 23 eingereicht, die die entsprechenden ursprünglichen Patentansprüche im weiteren Verfahren ersetzen sollen. Außerdem wird der neue Anspruch 26 ergänzend eingereicht. Es wird um Fortsetzung des Verfahrens der internationalen vorläufigen Prüfung auf der Grundlage der geänderten Unterlagen gebeten.

Die Ansprüche wurden wie folgt geändert. Im Anspruch 1 wurde in Zeile 1 "zellspurbasierte Untersuchung" durch "Manipulierung" ersetzt. Diese Änderung stützt sich auf die Beschreibung (Seite 3, Abs. 2, 3). Demnach sind Verfahren zur zellspurbasierten Untersuchung (Zelluntersuchung und Zellbehandlung) und zur Manipulierung biologischer Zellen Gegenstand der Erfindung. Der Begriff "Manipulierung" wird als Oberbegriff für die verschiedenen Gesichtspunkte gewählt. Die neuen Ansprüche 17 und 23 wurden entsprechend geändert. Der neue Anspruch 26 basiert auf der Beschreibung (Seite 9, Abs. 3). Die unabhängigen Ansprüche

wurden gegenüber Entgegenhaltung D1 (FR-A-2 743 421) abgegrenzt.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Manipulierung biologischer Zellen mit den Merkmalen gemäß dem Oberbegriff von Anspruch 1. Ein gattungsgemäßes Verfahren ist aus Entgegenhaltung D1 bekannt. Entgegenhaltung D1 betrifft ein Verfahren zur Bewertung der Wanderung von Keratinocyten. Keratinocyten sind Zellen der Epidermis, die besonders viele aus Keratin aufgebaute Intermediärfilamente enthalten. Das Verfahren gemäß Entgegenhaltung D1 ist auf die Bewertung von biologischen, chemischen oder physikalischen Bedingungen gerichtet, die die Wanderungsfähigkeit der Zellen beeinflussen. Die Bewertungen ermöglichen Anwendungen in der Dermatologie und Kosmetik.

Die in Entgegenhaltung D1 beschriebene Technik ist auf die Untersuchung von Keratinocyten beschränkt. Wandernde Keratinocyten hinterlassen auf festen Substraten Spuren in Form von Einprägungen (siehe z. B. S. 3, Z. 3 ff.), wie sie beispielsweise in Fig. 1 E gezeigt sind. Die Einprägungen sind in Fibrillen-Faserstrukturen des Substrats gebildet.

Das in Entgegenhaltung D1 beschriebene Verfahren ermöglicht es nicht, belastungsarme Zelluntersuchungen an den wandernden Zellen durchzuführen. Die Untersuchungen erfolgen entweder an den Zellen selbst (z. B. Seite 4, Zeile 8) oder an den Spuren, die aber lediglich aus den Einprägungen bestehen und damit die Ermittlung von Informationen über die Zellen nur in außerordentlich eingeschränkter Weise ermöglichen.

Demgegenüber werden erfindungsgemäß Verfahren zur Manipulierung biologischer Zellen bereitgestellt, bei denen Zellspuren in Form von Materialrückständen der Zellen erzeugt und diese untersucht oder anderweitig behandelt oder verwendet werden. Die Materialrückstände sind insbesondere Bestandteile der Membranen, des Zytoplasmas und/oder genetischer Materialien. Dies

wird aus der Beschreibung (Seite 6, Abs. 1, Seite 8, Abs. 1, Seite 9, Abs. 3) ersichtlich.

Die Patentfähigkeit des Gegenstands von Anspruch 1 ist aus den folgenden Gründen gegeben. Die Neuheit ergibt sich aus der Abgrenzung. Die erfinderische Tätigkeit ist gegeben, da Entgeghaltung D1 ausdrücklich auf die Untersuchung von Einprägungen in Substraten, die durch Keratinocyten verursacht werden, beschränkt ist und keinerlei Anregung auf die Untersuchung von materiellen Zellspuren gibt.

Die entsprechenden Argumente gelten auch für die übrigen unabhängigen Ansprüche. Dabei ist zu betonen, dass die Erzeugung von Zellspuren schon seit Jahren, nämlich seit 1985, bekannt ist. Die gezielte Ausnutzung von Eigenschaften und Bestandteilen der Zellspuren zur Manipulierung, insbesondere Untersuchung oder Kultivierung der Zellen, zu verwenden, wurde jedoch erstmalig durch die vorliegende Erfindung vorgeschlagen. Nachdem zwischen den ersten Beschreibungen der Zellspuren und deren erfindungsgemäßer Verwendung mindestens 15 Jahre vergangen sind, kann von einem Naheliegen der Gegenstände der unabhängigen Ansprüche nicht die Rede sein. Dies gilt insbesondere mit Blick auf die starke Entwicklung der Biotechnologie und Gentechnik gerade in diesem zurückliegenden Zeitraum.

Nachdem die Unterlagen überarbeitet und die Patentfähigkeit der Erfindung begründet wurden, wird die Prüfungsstelle gebeten,

einen internationalen vorläufigen Prüfungsbericht mit einer positiven Einschätzung der Patentfähigkeit zu übermitteln.


Dr. Oliver Hertz
Patentanwalt

Anlage

Neue Ansprüche 1, 17, 23 und 26 (3-fach)

Patentansprüche 1, 17, 23 und 26

1. Verfahren zur Manipulierung biologischer Zellen, bei dem die Zellen (16, 76a, 76b) auf ein zumindest teilweise strukturiertes und/oder oberflächenmodifiziertes Substrat (11, 31, 41, 51, 61, 71) aufgebracht werden und sich adhärent über Bahn-Oberflächenbereiche (13, 15, 17, 35, 45, 55, 57, 77a, 77b) des Substrats unter Erzeugung von Zellspuren (14a, 14b, 34, 44) bewegen,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Zellspuren (14a, 14b, 34, 44) aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen und an den Zellspuren Zelluntersuchungen durchgeführt werden.

17. Vorrichtung zur Manipulierung biologischer Zellen (16, 76a, 76b) mit einem Substrat (11, 31, 41, 51, 61, 71) mit Oberflächenbereichen (12, 52, 72), an denen die Zellen schlechter adhärieren als auf Bahn-Oberflächenbereichen (13, 15, 17, 35, 45, 55, 57, 77a, 77b), in denen die Zellen gut anhaften und sich adhärent bewegen können,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Bahn-Oberflächenbereiche zur Anhaftung von Zellspuren (14a, 14b, 34, 44) aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen eingerichtet sind.

23. Verfahren zur Manipulierung biologischer Zellen, bei dem die Zellen (16) auf ein zumindest teilweise strukturiertes und/oder oberflächenmodifiziertes Substrat (11) aufgebracht werden und sich adhärent über die Oberfläche des Substrats unter Erzeugung von Zellspuren (14a, 14b) bewegen,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Zellspuren (14a, 14b) aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen und auf den Zellspuren eine Kulti-

vierung von Zellen gleichen oder andersartigen Typs durchgeführt wird.

26. Verfahren zur Manipulierung biologischer Zellen, bei dem die Zellen (16, 76a, 76b) auf ein zumindest teilweise strukturiertes und/oder oberflächenmodifiziertes Substrat (11, 31, 41, 51, 61, 71) aufgebracht werden und sich adhärent über Bahn-Oberflächenbereiche (13, 15, 17, 35, 45, 55, 57, 77a, 77b) des Substrats unter Erzeugung von Zellspuren (14b) bewegen,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Zellspuren (14b) aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen, die genetische Materialien der Zellen enthalten, und die genetischen Materialien einer Amplifizierung und das amplifizierte genetische Material einer genetischen Analyse unterzogen werden.

14692/US Hz/ap

CLAIMS 1, 17, 23, and 26

(as amended during PCT Chapter II procedure)

1. A process for the manipulation of biological cells, in which the cells (16, 76a, 76b) are applied to a substrate (11, 31, 41, 51, 61, 71), which is at least partially structured and/or surface modified, and move adhesively over the surface track regions (13, 15, 17, 35, 45, 55, 57, 77a, 77b) of the substrate while producing cell traces (14a, 14b, 34, 44),
characterized in that
the cell traces (14a, 14b, 34, 44) consist of material residues separated from the cells and cell tests are performed on the cell traces.
17. A device for cell trace based testing of biological cells (16, 76a, 76b) with a substrate (11, 31, 41, 51, 61, 71) having surface regions (12, 52, 72), on which the cells adhere more poorly than on surface track regions (13, 15, 17, 35, 45, 55, 57, 77a, 77b), in which the cells adhere well and can move adhesively,
characterized in that
the surface track regions are arranged for the adhesion of cell traces (14a, 14b, 34, 44) consisting of material residues separated from the cells.
23. A process for cell trace based cultivation of biological cells, in which the cells (16) are applied to an at least partially structured and/or surface modified substrate (11) and move adhesively over the surface of the substrate while producing cell traces (14a, 14b),
characterized in that
the cell traces (14a, 14b) consist of the material residues separated from the cells, and a cultivation of the same or a different type of cells is performed on the cell traces.

26. The process for the manipulation of biological cells, in which the cells (16, 76a, 76b) are applied to a substrate (11, 31, 41, 51, 61, 71), which is at least partially structured and/or surface modified, and move adhesively over surface track regions (13, 15, 17, 35, 45, 55, 57, 77a, 77b) of the substrate while producing cell traces (14b),

characterized in that

the cell traces (14b) consist of material residues separated from the cells which contain genetic materials of the cells, and the genetic materials are subjected to amplification and the amplified genetic material is subjected to a genetic analysis.

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : G01N 33/483, C12N 5/00		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/36415
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Juni 2000 (22.06.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/09781 (22) Internationales Anmeldedatum: 10. Dezember 1999 (10.12.99) (30) Prioritätsdaten: 198 57 692.7 14. Dezember 1998 (14.12.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EVOTEC BIOSYSTEMS AG [DE/DE]; Schnackenburgallee 114, D-22525 Hamburg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FUHR, Günter [DE/DE]; Kavalierstrasse 15, D-13187 Berlin (DE). HAGEDORN, Rolf [DE/DE]; Wartiner Strasse 16, D-13057 Berlin (DE). SHIRLEY, Stephen, Graham [GB/GB]; Victoria Main Street, Brandon, Warwickshire CV8 3NW (GB). RICHTER, Ekkehard [DE/DE]; Walkürenstrasse 3A, D-10318 Berlin (DE). (74) Anwalt: HERTZ, Oliver, v. Bezold & Sozien, Akademiestrasse 7, D-80799 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	
(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR THE CELL-TRACK-BASED EXAMINATION AND CULTIVATION OF CELLS (54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR ZELLSPURBASIERTEN ZELLUNTERSUCHUNG UND ZELLKULTIVIERUNG (57) Abstract <p>The invention relates to a method for the cell-track-based examination of biological cells, according to which the cells (16) are applied to an at least partly structured and/or surface-modified substrate (11) and move across track areas (13, 15) of the surface of the substrate in an adhesive manner such that they generate cell tracks (14a, 14b) which consist of material residues separated by the cells. The cells are then studied on the basis of these tracks. The invention further relates to a method for cultivating cells on substrates modified in a biocompatible manner whose surfaces are covered in cell tracks.</p>			
(57) Zusammenfassung <p>Verfahren zur zellspurbasierten Untersuchung biologischer Zellen, bei dem die Zellen (16) auf ein zumindest teilweise strukturiertes und/oder oberflächenmodifiziertes Substrat (11) aufgebracht werden und sich adhärent über Bahn-Oberflächenbereiche (13, 15) des Substrats unter Erzeugung von Zellsuren (14a, 14b) bewegen, die aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen, werden Zelluntersuchungen an den Zellsuren durchgeführt. Es wird auch ein Verfahren zur Zellkultivierung auf biokompatibel modifizierten Substraten beschrieben, deren Oberflächen von Zellsuren bedeckt sind.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren und Vorrichtung zur zellspurbasierten
Zelluntersuchung und Zellkultivierung

Die Erfindung betrifft Verfahren und Vorrichtungen zur Zelluntersuchung, insbesondere Zellassays oder Zell-Testanordnungen, deren Herstellung und Verfahren zu deren Verwendung. Die Erfindung betrifft auch Verwendungen von Zellspuren auf Substratoberflächen.

In der Pharmakologie, Toxikologie und medizinischen Diagnostik nehmen zellbasierte Assays (Reaktionsansätze, Prüfansätze o. dgl.) eine Schlüsselstellung ein. Gesucht werden rasch handhabbare und hochspezifische Untersuchungs- und Nachweisverfahren für biologische Zellen an sich oder für deren Wechselwirkungen mit anderen Zellen oder mit natürlichen oder synthetischen Fremdsubstanzen. Darüber hinaus wäre es wünschenswert, wenn die zum Nachweis einer Substanz, eines Zelltyps, einer Medikamentwirkung etc. benutzten Zellen wiederverwendbar (d.h. weiter kultivierbar) wären. Im medizinischen Bereich bedeutet das z.B. eine Rückführung in den Organismus des Spenders (z. B. eines Patienten) oder eines anderen menschlichen Empfängers. Für derartige Prozeduren werden jedoch neben der Sterilität sehr hohe Anforderungen daran gestellt, daß sich die Zelleigenschaften durch die Untersuchungen oder Analyse nicht verändern. So ist eine Markierung (z.B. für die Fluoreszenzerzeugung), wie sie bei der Immunofluorochromierung verwendet wird, ausgeschlossen, da die Folgereaktionen derart kontaminierter Zellen bei einer nachfolgenden Kultivierung oder im Empfängerorganismus nur schwer abschätzbar sind.

Es besteht ferner ein Interesse daran, Zelluntersuchungen spezifisch an Einzelzellen durchzuführen. Für ein statistisch ab-

gesichertes Untersuchungsergebnis muß eine genügend hohe Zahl von Einzelzellen untersucht werden. Daraus ergibt sich ein Bedarf an bisher nicht verfügbaren Paralleluntersuchungen an einer Vielzahl von Einzelzellen unter möglichst gleichartigen Bedingungen.

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, extrem belastungsarme, auch für den medizinischen Bereich einsetzbare Verfahren und Vorrichtungen zur Zelluntersuchung zu entwickeln, die mit möglichst vielen bereits erprobten hochspezifischen Nachweistechiken, wie z.B. Immunofluorochromierung von Proteinen, Nukleotiden und Lipiden, als auch zerstörenden Verfahren wie z.B. Röntgen- oder Elektronenstrahlmikroanalyse kombiniert werden können und die parallele Untersuchung einer Vielzahl von Einzelzellen erlauben. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, neue Anwendungen von Zellspuren anzugeben.

Diese Aufgabe wird durch Verfahren und Vorrichtungen mit den Merkmalen gemäß den Patentansprüchen 1 bzw. 17 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Verwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Die Grundidee der Erfindung besteht insbesondere darin, zur Untersuchung oder -kultivierung von biologischen Zellen oder deren Wechselwirkungen mit anderen Zellen oder Substanzen zunächst auf einer Substratoberfläche Zellspuren der zu untersuchenden Zellen zu erzeugen und dann diese Zellspuren der gewünschten Analyse oder Untersuchung zu unterziehen. Die Erzeugung von Zellspuren durch adhärent auf Oberflächen wachsende oder sich bewegende Zellen ist an sich bekannt und wird beispielsweise von E. D. Hay et al. in "Exp. Biol. Med.", Bd. 10, 1985, S. 174 ff., beschrieben. Die Strukturen und Eigenschaften von Zellspuren werden unten unter Bezug auf die Figuren 2 und 3 erläutert. Die Erzeugung der Zellspuren erfolgt vorzugsweise unter Verwendung von Substratoberflächen, die zu-

mindest teilweise in geeigneter Weise mikrostrukturiert und/oder modifiziert sind. Die Mikrostrukturierung der Substratoberfläche ist insbesondere dazu vorgesehen, die Zellspurerzeugung in bestimmten Substratbereichen, z.B. entlang bestimmter Pfade, zu fördern und in anderen Substratbereichen zu behindern oder auszuschließen. Die Oberflächenmodifizierung führt ferner dazu, daß nicht nur die auf natürliche Weise auf dem Substrat zurückbleibenden Materials Spuren untersucht werden können, sondern auch künstlich abgetrennte Materialrückstände (Erzielung größerer Spurmengen). Hierzu umfaßt die Substratmodifizierung insbesondere die Aufbringung von Molekülen, die Bindungsstellen anbieten, an denen spezifisch ein vorbestimmtes, gesuchtes Zelloberflächenmolekül ankoppeln kann.

Die erfindungsgemäß eingesetzten Untersuchungsmethoden umfassen alle an sich zur Zelluntersuchung und Zellbehandlung bekannten Techniken, wobei sowohl zerstörungsfreie als auch zerstörende Techniken oder gegebenenfalls biochemische Verstärkungstechniken (z.B. PCR-Prozeß) eingesetzt werden können.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung von Zellspuren zur Manipulierung der Wechselwirkung biologischer Zellen mit festen Substraten. Durch gezieltes Aufbringen von Zellspuren auf synthetischen oder biologischen Substraten entsprechend den in der vorliegenden Beschreibung erläuterten Prinzipien werden biokompatible Träger für die zu manipulierenden biologischen Zellen bereitgestellt. Die Manipulation besteht insbesondere in der gezielten Zellkultivierung (Gewebeaufbau) auf den mit Zellspuren belegten Substratbereichen.

Die erfindungsgemäß verwendeten Substratoberflächen können aus synthetischem, anorganischem oder organischem Material bestehen oder auch durch biologisches Material (z.B. Knochenmaterial) gebildet werden.

Die Erfindung besitzt die folgenden Vorteile. Es wird erstmalig ein einzelzellspezifisches Verfahren zur Zelluntersuchung angegeben, bei dem die untersuchte Zelle durch den Untersuchungsvorgang unbeeinflusst und unverändert bleibt. Dies erlaubt eine erhebliche Erweiterung der Anwendung von Einzelzelluntersuchungen in der Pharmakologie, Toxikologie, medizinischen Diagnostik und Biochemie. Die Zelluntersuchung kann hochgradig parallel an einer Vielzahl von Zellen durch gleichzeitige Erzeugung vieler Spuren auf einem Substrat durchgeführt werden. Da durch die Mikrostrukturierung der Oberflächen eine Zuordnung einer Zellspur zu einer untersuchten Zelle (Spenderzelle) möglich ist, bleibt die hochparallele Einzelzelluntersuchung ebenfalls zellspezifisch. Die Mikrostrukturierung der Substratoberfläche kann vorzugsweise nach Techniken erfolgen, wie sie an sich aus der Halbleiterprozessierung bekannt sind.

Erfindungsgemäß werden die Zellen außer durch die Spurenerzeugung durch keinerlei Färbungs- oder Markierungstechniken belastet. Sie sind damit nicht kontaminiert oder verändert und können einer medizinischen Verwendung bzw. einer Kryokonservierung oder einer weiteren Kultivierung unterworfen werden. Statt wie bisher in Zellen werden die Zellrückstände einer spezifischen Markierung oder Bewertung unterworfen. Diese kann durchaus auch zerstörend sein (z.B. schrittweiser enzymatischer Abbau) oder über Immunofluorochromierung in toxischen Konzentrationsbereichen erfolgen.

Die erfindungsgemäße Zellkultivierung besitzt den Vorteil, daß mit Zellspuren beliebige Substratmaterialien, wie sie beispielsweise für die Implantation von Knochenmaterialien von Interesse sind, biokompatibel gemacht werden können. Es werden neuartige Substrate zum in-vitro-Gewebeaufbau geschaffen, die einen erheblich erweiterten Anwendungsbereich besitzen. Durch die zellspurbasierte Modifikation von Substratoberflächen können anwendungsabhängig optimierte Zellkulturen auf optimierte

Substratmaterialien aufgebracht werden, die ohne die Zellspuren gegebenenfalls nicht miteinander kompatibel wären.

Weitere Ausführungsbeispiele und Vorteile der Erfindung werden im folgenden unter Bezug auf die beigefügten Zeichnungen beschrieben. Es zeigen

- Fig. 1 den prinzipiellen Aufbau eines erfindungsgemäßen zellspurbasierten Systems (Ausschnitt),
- Fig. 2 eine schematische Illustration der Grundstrukturen von Zellspuren in Form von Filamenten (A) und Membranflecken (B),
- Fig. 3 eine Illustration der Wirkungsweise eines modifizierten Substrats,
- Fig. 4 eine Illustration zur erfindungsgemäßen Fluoreszenzuntersuchung von Zellspuren,
- Fig. 5 ein Ausführungsbeispiel der Erfindung, bei dem das in Fig. 1 illustrierte Grundprinzip mit einer Vielzahl paralleler Bahnen realisiert ist,
- Fig. 6 ein weiteres Ausführungsbeispiel der Erfindung mit einer Vielzahl paralleler Zellbahnen, und
- Fig. 7 ein weiteres Ausführungsbeispiel der Erfindung mit sich kreuzenden Zellbahnen.

In Fig. 1 ist der prinzipielle Aufbau eines erfindungsgemäßen zellspurenbasierten Systems dargestellt. Ein Substrat 11 ist in seiner Oberfläche im μm - und mm -Bereich wie folgt strukturiert bzw. in seinen Oberflächeneigenschaften verändert.

Durch Bereiche 12 der Oberfläche, an denen Zellen nur schlecht adhärieren können, und Bereiche 13, 15, 17 (Bahn-Oberflächenbereiche), wo Zellen gut anhaften können, wird eine Vorzugsbahn gebildet, auf der sich eine Zelle 16 aktiv bewegen kann. Das Feld 15 im Bahn-Oberflächenbereich ist so modifiziert worden (chemisch, mechanisch etc.), daß hier die Zellen Teile ihrer Membran und inneren Bestandteile 14a, 14b verlieren, die am Substrat anhaften. Im gezeigten Beispiel sind es Filamente 14a und Membranflecken (oder Membranpatches) 14b, die unten unter Bezug auf die Fig. 2A und 2B im einzelnen erläutert werden. Die Zelle bewegt sich weiter in Richtung des Pfeiles 18. Die Zellsur kann nunmehr zerstörungsfrei oder zerstörend analysiert werden. Das zurückgelassene Material charakterisiert die Spenderzelle hinsichtlich der Membranzusammensetzung (Rezeptoren, Carrier, Lipide usw.), aber auch hinsichtlich innerer Bestandteile des Zytoplasmas, woraus sich medizinische, toxikologische, pharmakologische und andere Anwendungen ableiten lassen. Auf einer Bahn kann sich entweder eine oder mehrere Zellen bewegen und Spuren erzeugen.

Das Substrat 11 besteht beispielsweise aus Glas, Glimmer, anorganischem Kristallmaterial oder Halbleitermaterial. Die Substratoberfläche ist einerseits zur Ausbildung der Vorzugsbahn strukturiert bzw. modifiziert, auf der sich die Zelle bevorzugt bewegt und Zellspuren hinterläßt. Die Oberflächenbereiche 12, an denen Zellen nur schlecht adhärieren können, tragen beispielsweise eine Beschichtung mit negativ geladenen Molekülen, vorzugsweise aus Polymeren mit möglichst vielen OH^- -Gruppen, wie z. B. Poly-HEMA. Beispiele für die Beeinflussung der Bereiche 13, 15, 17, in denen die Zellen gut anhaften können, werden unten gegeben. Andererseits umfaßt die Mikrostrukturierung und/oder Modifizierung der Substratoberfläche eine örtlich selektive Beeinflussung der Vorzugsbahn zwischen den Bereichen 12 der Substratoberfläche. Die Segmentierung der Vorzugsbahn z.B. in die Bereiche 13, 15 und 17 ist dazu vorgesehen, daß je nach

der Gestaltung des jeweiligen Bereiches die Zellspuren besonders zahlreich oder besonders gering oder in Bezug auf eine bestimmte Zusammensetzung zurückgelassen werden. Dies wird auch aus den unten erläuterten Beispielen ersichtlich.

Die Mikrostrukturierung bzw. Modifizierung der Vorzugsbahn umfaßt beispielsweise:

1. Aufbringen von den molekularen Zellkontakt erhöhenden Schichten (z.B. Fibronectin, Polylysin, Alginate etc.). Die Schichtdicke kann anwendungsabhängig von der Dicke einer Moleküllage bis hin in den μm -Bereich gewählt werden. Die Molekülmonolagen werden vorzugsweise mit der Langmuir-Blodgett-Technik aufgebracht. Generell sind zur Schichtaufbringung auch Dickschichttechniken und/oder Plasmabehandlungen einsetzbar.
2. Nano- bzw. Mikrostrukturisierung von Oberflächen, d.h. Aufbringen von Mustern in nm- bzw. μm -Dimensionen, an denen Membranteile, insbesondere aber natürliche Kontaktmoleküle der Zelle, wie die der Integrin- und Catherinfamilie anhaften können (z.B. Strukturierung über die Photo- oder Elektronenstrahl-Lithographie).
3. Submikrometer und atomare Aufrauung oder Reliefbildung auf Oberflächen (kleinste Widerhaken etc.).

Die Substratbeschickung (Aufbringung der Zellen) erfolgt beispielsweise durch Aufspülen aus einer Suspension, beispielsweise durch einen Kanal des Mikrosystems, mit einem Manipulator (Kapillare, separates Mikrosystem oder optische Pinzette) oder auch durch aktives Aufwachsen.

Bei der Wanderung der Zellen über Substratoberflächen (z.B. über eine saubere Glasoberfläche) hinterlassen die Zellen unter

physiologischen Bedingungen filamentöse oder fleckenartige Spuren, die im folgenden als Filament bzw. Membranfleck bezeichnet und unter Bezug auf die Fig. 2A bzw. 2B erläutert werden. Die Spuren sind in der Regel Strukturen, die membranumhüllt und mit Zellinhalten gefüllt sind. Typische Größen dieser Strukturen liegen in Bezug auf die Breite und Höhe im μm - und Sub- μm -Bereich. Während die Länge eines Membranflecks in der Regel im wesentlichen seiner Breite entspricht, ist die Länge eines Filaments variabel. Die Filamentlänge kann bis zu einige Millimeter betragen. Die interessierenden Bestandteile der Zellen, die auch in den Zellspuren auffindbar sind, sind Membranproteine 210, Oberflächenproteine und -rezeptoren 211, 212, Zytoplasmabestandteile 213, 214 und die Lipide 215 in der Membran (s. Fig. 2A). Bei den Membranflecken treten neben diesen Bestandteilen, die in Fig. 2B z.B. die Membranproteine 220 und die Lipidzusammensetzung 225 umfassen, ferner Vesikeln 221, Organellen 222 und genetisches Material 223 auf. Außerdem ist auch Zytoplasma 224 vorhanden. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde erstmalig festgestellt, daß die Zellspuren analysfähiges Material, das u.a. die genannten Bestandteile umfaßt, in ausreichender Menge enthalten. Dies bedeutet, daß die an sich bekannten Analyse- oder Untersuchungsverfahren vorteilhafterweise ohne gesonderte Anreicherungsschritte implementiert werden können.

Die Oberflächenproteine und -rezeptoren 211, 212 umfassen beispielsweise ein Spurenprotein 211 in der Membran und einen angekoppelten Rezeptor 212 mit einer chromophoren Gruppe. Vom Rezeptor 212 wird bei geeigneter Lichtanregung Fluoreszenzlicht ausgestrahlt, das das Vorhandensein des Spurenproteins 211 anzeigt. Da die Rezeptorankopplung proteinspezifisch erfolgt, kann mit dem Fluoreszenzlicht der in der Spur vorhandene Proteinkomplex nachgewiesen werden.

In analoger Weise lassen sich auch andere Nachweistechiken implementieren, wie sie beispielsweise bei den ELISA- und RIAS-Assays vorgesehen sind.

Erfindungsgemäß erfolgt somit an den Zellspuren der spezifische Nachweis bestimmter Bestandteile der Spenderzelle. Die Bestandteile können auf der Oberfläche oder im Inneren der Zellspuren angeordnet sein. Im letzteren Fall ist vorgesehen, die Membran der Zellspur mit geeigneten Lösungsmitteln aufzulösen oder mechanisch oder elektrisch zu permeieren. Die zerstörende Messung an den Zellspuren ohne Veränderung der Spenderzelle zur Erfassung von molekularen oder mikroskopischen Bestandteilen in den Zellspuren stellt einen besonderen Vorteile der Erfindung dar.

Die zellspurbasierten Analysen sind in besonderer Weise zur Kombination mit hochempfindlichen Meßtechniken geeignet. Diese umfassen beispielsweise die Fluoreszenz-Korrelationsanalyse zum Einzelmolekülnachweis und zur Bestimmung von Bindungskonstanten, die Massenspektrometrie zur Elementaranalyse und die konfokale Laserscanningmikroskopie. Genetisches Material in den Spuren kann z.B. über einen PCR-Prozeß amplifiziert werden, wodurch eine neuartige, die Spenderzelle in ihren physiologischen Zellen nicht beeinflussende Technik einer genetischen Analyse gegeben ist.

Für einzelzellbasierte Assays und Nachweisverfahren können auch die folgenden Prozeduren angewendet werden.

1. Die Menge der Zellrückstände wird als quantitatives Maß für die Stärke des Anhaftens der Spenderzelle an der Substratoberfläche und somit für die Menge bestimmter Bindungskomplexe in deren Membran erfaßt.
2. Die Spurenstruktur wird als Maß erfaßt, z.B. die Verhält-

nisse des Anteils an Filamenten zum Anteil an Verzweigungen, zum Anteil an Patches usw. (Vergleich von Zellspurgrundelementen in ihrer Quantität).

3. Die Materialzusammensetzung der Spuren wird als Maß erfaßt, z.B. Lipid/Proteinanteil, spezifisches Auftreten bestimmter Rezeptoren (u.a. der Immunglobulinfamilien), spezifisches Auftreten von Lipiden, Nukleotiden etc.
4. Charakterisierung zytoplasmatischer Rückstände, insbesondere genetischen Materials in den Rückständen der Zellen.
5. Vergleich von Änderungen in einem der Punkte 1 bis 4 nach Behandlung der spurerzeugenden Zelle (z.B. mit Pharmaka, toxischen Substanzen etc.).
6. Die Stabilität der Spur gegen mechanische, elektrische, akustische, optische oder chemische Behandlungen wird als Maß erfaßt.
7. Die Elementzusammensetzung der Spuren oder Teile derselben (z.B. Na, K, P...) werden als Maß erfaßt.
8. Passive elektrische Parameter der Zellrückstände, wie Impedanz, Durchschlagsfestigkeit, nichtlineares Verhalten oder Erwärmung werden als Maß erfaßt.
9. Optische Parameter der Spuren werden als Maß erfaßt, wie Absorption, Transmission, nichtlineare Eigenschaften etc.
10. Mechanische Eigenschaften der Spuren, wie Elastizität, Plastizität usw. werden als Maß erfaßt.
11. Die Veränderung einer Zellspur durch eine nachfolgende Zelle der gleichen oder einer anderen Art wird als Maß

erfaßt.

12. Die Spurcharakterisierung erfolgt nach einer Fixierung bzw. Kontrastierung, z.B. mittels hochauflösender Mikroskopverfahren (Rasterelektronenmikroskopie, AFM, SNOM etc.).
13. Ein Negativ oder anderes Duplikat oder eine Vervielfachung von Spurenteilen wie bei der PCR-Technik wird als Maß für den Vergleich benutzt.
14. Die Adhäsion anderer Materialien, wie hochspezifisch bindender Beads oder nm-Teilchen werden als Maß für den Vergleich erfaßt.

Die hier genannten Maße werden als für die Spenderzellen spezifischer Größen erfaßt, die bei gegebenen Vergleichswerten eine Charakterisierung der Spenderzelle oder bei Vergleich der Maße mit den entsprechenden Ergebnissen bei anderen Zellen zur Charakterisierung des unterschiedlichen Verhaltens der Zellen verwendet werden.

Im folgenden werden unter Bezug auf die Fig. 3 bis 7 Ausführungsformen erfindungsgemäßer Vorrichtungen erläutert. Dabei wird auf Einzelheiten der erfindungsgemäß eingesetzten Substratoberflächen eingegangen. Nicht dargestellt sind Einzelheiten einer Gesamtapparatur zur Zellspuruntersuchung, da diese in Bezug auf die Handhabung von Assays bzw. von mit Proben beschickten Substraten und die Anpassung an die jeweils gewünschten Untersuchungsmethoden an sich bekannt sind.

Die Fign. 3 und 4 sind schematische Schnittansichten von Substraten 31, 41, die jeweils mit einer Modifizierungsschicht 32 bzw. 42 im Bahn-Oberflächenbereich 35 bzw. 45 zur bevorzugten Anhaftung von Zellen und Hinterlassung von Zellspuren 34 bzw. 44 ausgestattet sind. Die Modifizierungsschicht 32 (bzw. 42)

bietet Bindungsstellen an, an denen spezifisch ein vorbestimmtes, gesuchtes Zelloberflächenmolekül 33 (bzw. 43) ankoppeln kann. Eine Zelle, die derartige Moleküle in ausreichender Zahl besitzt, wird dementsprechend fester gebunden sein und mehr Spurenmaterial 34 (bzw. 44) bei ihrer Wanderung über das Substrat zurücklassen als andere Zelltypen. Die Erfassung der Menge des zurückgelassenen Materials (z.B. mit optischen Mitteln) liefert eine Aussage über den Gehalt des vorbestimmten Zelloberflächenmoleküls an der untersuchten Zelle. Die Zelle selbst wird durch die Messung nicht belastet.

Falls die Menge des Zellspurmaterials zu gering für eine sichere direkte Auswertung ist, so kann die Zellspurvermessung gemäß Fig. 4 modifiziert sein. Nach der Erzeugung der Zellspuren 44 werden diese mit der Lösung eines Fluoreszenzmarkers behandelt, der als Markermolekül 46 z.B. in die Lipidteile der Zellspur 44 unspezifisch eingebaut wird. Bei geeigneter Lichtanregung und Fluoreszenzmessung kann aus der Intensität des Fluoreszenzlichts auf die Zahl der Markermoleküle 46 und damit auf die quantitative Menge des Zellspurmaterials 44 rückgeschlossen werden.

Die Vorzugsbahn gemäß Fig. 1 bzw. der modifizierte Bahn-Oberflächenbereich 35 (oder 45) gemäß den Fig. 3 (oder 4) können einfach oder mehrfach mit den verschiedensten Geometrien auf dem Substrat ausgebildet sein. Im folgenden werden gerade Vorzugsbahnen beschrieben. Es sind jedoch bei geeigneter Substratstrukturierung auch gekrümmte (z.B. kreisförmige) Vorzugsbahnen möglich.

Fig. 5 zeigt ein Beispiel für eine parallele Ausführung des in Fig. 1 erläuterten Grundprinzips mit einer Vielzahl parallel verlaufender, gerader Vorzugsbahnen.

Auf einem Substrat 51, das z.B. aus Glas, Silizium oder Kunststoff bestehen kann, sind die Zelladhäsion unterbindende Materialien 52 aufgebracht.

Dadurch entstehen eine Vielzahl von Bahnen 57 (Bahn-Oberflächenbereiche), auf denen sich Zellen adhärent bewegen können. Die Bahnen 57 reichen von Eingangsdepots 53 über Oberflächenfelder 55 bis hin zu Ausgangsdepots 58. Die Oberflächenfelder 55 sind so behandelt, daß bevorzugt Zellspuren erzeugt werden. Erreichen die Zellen die ebenfalls für die Adhäsion präparierten Ausgangsdepots 58, so werden sie dort festgehalten bzw. entnommen, um einer Kultivierung, Kryokonservierung oder einer anderen Prozedur unterzogen zu werden. Die Analyse der Spur kann mit allen gängigen Mikronachweisverfahren erfolgen (Fluoreszenz, Isotopenmarkierung, Elementanalyse etc.). Die Oberflächenfelder 55 mit den Zellspuren (nicht dargestellt) sind als Segmente der Bahnen 57 als Reihe, jeweils mit dem gleichen Abstand von dem jeweiligen Eingangsdepot 53 angeordnet. Dies erleichtert die parallele, simultane Auswertung der Zellspuren.

In Fig. 6 ist eine Substratoberfläche in Form eines Mikrosystems gezeigt, die in ähnlicher Weise in verschiedene Oberflächenbereiche kompartimentiert wurde, wie das in Fig. 5 der Fall ist. Das Substrat besteht hier jedoch entweder aus zwei Teilen 61a, 61b oder einem Teil mit einer Sollbruchstelle 61c. Auf den Feldern 65 hinterlassen die Zellen Spuren. Sind sie auf ihrer Wanderung über das Substrat in den Ausgangsdepots 68 angekommen, so wird das Teil 61b entfernt oder abgebrochen. Wie im linken Teil von Fig. 6 gezeigt ist, befinden sich dann die Spuren und Zellen auf jeweils getrennten Substraten 31 und 32, so daß sie auf verschiedene Weise weiterbehandelt werden können.

In Analogie zu diesen Ausführungen lassen sich Oberflächen mit weitaus mehr Zellwegen erzeugen, in denen parallel die Spuren

vieler Zellen so, daß sie eindeutig zuzuordnen sind, erzeugt und charakterisiert werden können.

Fig. 7 zeigt eine Substratoberfläche, die derart strukturiert ist, daß sich zwei Vorzugsbahnen, die für die Wanderung der Spenderzellen eingerichtet sind, kreuzen. Auf dem Substrat 71 verlaufen die Bahnen 77a und 77b im wesentlichen senkrecht zueinander. Im Kreuzungsbereich 75 ist eine Oberflächenmodifizierung oder -strukturierung zur Förderung des Anhaftens von Zellspuren angebracht, wie sie oben erläutert wurde. Außerhalb der Bahnen 77a bzw. 77b ist das Substrat 71 so strukturiert, daß dort keine Zellwanderung stattfindet und keine Zellspuren anhaften.

Mit der in Fig. 7 gezeigten Anordnung lassen sich vorzugsweise Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zellen untersuchen. Es kann z.B. vorgesehen sein, daß zunächst die Zelle 76a über den Bereich 75 wandert und dort Zellspuren hinterläßt. Anschließend wandert die Zelle 76b über denselben Bereich 75 mit den vorhandenen Zellspuren. Mit einem optisch-mikroskopischen Verfahren oder einem anderen Untersuchungsverfahren wird danach erfaßt, ob die Spuren der ersten Zelle 76a durch die zweite Zelle 76b verändert, überlagert oder entfernt wurden. Es kann ferner erfaßt werden, ob geometrische Korrelationen zwischen den Zellspuren auftreten, d.h. ob die Nachfolgezellen den Spuren der Vorgängerzellen folgen oder diese gerade meiden. Daraus lassen sich wiederum zellbasierte Assays für die Medizin, Biotechnologie und Pharmazie mit hoher Spezifik entwickeln. Ein Substrat mit gekreuzten Bahnen läßt sich wiederum zur Erzielung einer Parallelverarbeitung vielfach auf einem gemeinsamen Träger ausbilden.

Die Herstellung eines erfindungsgemäßen Substrats erfolgt vorzugsweise derart, daß zunächst ein Trägermaterial mit einer Beschichtung versehen wird, die für die Zellwanderung und

-adhäsion ungünstig ist (z.B. stark negativ geladene Moleküle). Anschließend wird diese Beschichtung entsprechend dem gewünschten Verlauf der Vorzugsbahnen durch Abtragen strukturiert, so daß das Trägermaterial entsprechend bestimmter geometrischer Formen frei liegt, die dann die Vorzugsbahnen bilden. Anschließend erfolgt anwendungsabhängig die Segmentierung der Vorzugsbahn, d.h. die Aufbringung einer Strukturierung und/oder Modifizierung des Trägermaterials zur verstärkten Zelladhäsion.

Die Bahnbreiten sind vorzugsweise an die charakteristische Ausdehnung einer adhärierten Zelle angepaßt und betragen rd. 50 µm. Die Bahnlängen können ebenfalls anwendungsabhängig ausgewählt werden. Sie betragen z.B. 3 bis 4 charakteristische Zelldurchmesser (d.h. rd. 150 bis 200 Mikrometer) bis hin zu größeren Längen im Millimeterbereich.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung erfolgt eine Aufbringung von Zellspuren auf Substraten zur Zellkultivierung. Als Substrate werden ebene oder anwendungsabhängig gekrümmt geformte Festkörpermateriale synthetischen oder biologischen Ursprungs verwendet. Es werden beispielsweise Glas-, Keramik- oder Kunststoffmaterialien oder auch polierte Knochenscheiben als Substrat verwendet. Um die jeweiligen Substratoberflächen mit einem biokompatiblen Überzug zu versehen, werden nach den oben erläuterten Prinzipien gewebeerzeugende Zellen, wie z.B. Chondrozyten, Osteoplasten oder Epithelzellen auf die Substratoberflächen aufgesetzt, um auf dieser unter Hinterlassung von Zellspuren zu wandern. Die Substratoberfläche kann zur Aufbringung möglichst umfangreicher Zellspuren strukturiert oder anderwertig modifiziert sein (s. oben). Nach Ausbildung einer geschlossenen Zellspuroberfläche erfolgt auf dem modifizierten Substrat ein Gewebeaufbau. Gewebeerzeugende Zellen, vorzugsweise des Typs, mit dem die Zellspuren erzeugt wurden, werden auf dem modifizierten Substrat kultiviert. Ein

Substrat mit kultivierten Gewebezellen wird dann anwendungsabhängig als Implantat in den menschlichen Körper eingesetzt.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur zellspurbasierten Untersuchung biologischer Zellen, bei dem die Zellen (16, 76a, 76b) auf ein zumindest teilweise strukturiertes und/oder oberflächenmodifiziertes Substrat (11, 31, 41, 51, 61, 71) aufgebracht werden und sich adhärent über Bahn-Oberflächenbereiche (13, 15, 17, 35, 45, 55, 57, 77a, 77b) des Substrats unter Erzeugung von Zellspuren (14a, 14b, 34, 44) bewegen, die aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen, und Zelluntersuchungen an den Zellspuren durchgeführt werden.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem zur Zelluntersuchung die Menge, die Geometrie, die chemische Zusammensetzung, die passiven elektrischen Parameter und/oder mechanische Eigenschaften der Zellspuren oder von deren Bestandteilen erfaßt werden.
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem zur Erfassung der Menge und Geometrie der Zellspuren Filamente (14a) und Membranflecken (14b) erfaßt werden.
4. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem zur Erfassung der Zusammensetzung der Zellspuren diese einer Färbung oder Markierung zur Durchführung mikroanalytischer Verfahren unterzogen werden.
5. Verfahren gemäß Anspruch 4, bei dem die mikroanalytischen Verfahren Fluoreszenzmessungen, Messungen auf der Basis von Isotopenmarkierungen oder Elementanalysen umfassen.

6. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem zur Erfassung der Zusammensetzung der Zellspuren diese einem enzymatischen Abbau unterzogen werden.
7. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem die Zellspuren mit einem hochauflösenden Mikroskopieverfahren untersucht werden.
8. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem zytoplasmatische Rückstände oder genetischen Materialien in den Zellspuren erfaßt werden.
9. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem die Stabilität der Zellspuren bei mechanischen, elektrischen, akustischen, optischen und/oder chemischen Behandlungen erfaßt wird.
10. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem zur Erfassung der passiven elektrischen Parameter der Zellspuren deren Impedanz, Durchschlagfestigkeit, nichtlineares Verhalten und/oder Erwärmung bei Stromdurchfluß erfaßt werden.
11. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem zur Erfassung mechanischer Eigenschaften der Zellspuren deren Elastizität oder Plastizität erfaßt werden.
12. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem eine Vervielfachung von Bestandteilen der Zellspuren zur Erzeugung von Referenzmaterial durchgeführt wird.
13. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Zellspuren in vorbestimmten Bahn-Oberflächenbereichen (13, 15, 17, 35, 45, 55, 57, 77a, 77b) erzeugt werden, die zumindest teilweise zur verstärkten Anhaftung der Zellen mikrostrukturiert und/oder modifiziert sind.

14. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Zellen nach der Erzeugung der Zellspuren einer medizinischen oder meßtechnischen Verwendung, einer Kryokonservierung oder einer weiteren Kultivierung unterzogen werden.

15. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem auf einer Vielzahl paralleler Bahnen eine Vielzahl von Zellspuren erzeugt und untersucht werden.

16. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem auf sich kreuzenden Bahnen Zellspuren erzeugt und an Kreuzungsbereichen der sich kreuzenden Bahnen die gegenseitigen Wechselwirkungen der beteiligten Zellen und/oder Zellspuren untersucht werden.

17. Vorrichtung zur zellspurbasierten Untersuchung biologischer Zellen (16, 76a, 76b) mit einem Substrat (11, 31, 41, 51, 61, 71) mit Oberflächenbereichen (12, 52, 72), an denen die Zellen schlechter adhärieren als auf Bahn-Oberflächenbereichen (13, 15, 17, 35, 45, 55, 57, 77a, 77b), in denen die Zellen gut anhaften und sich adhärent bewegen können, wobei die Bahn-Oberflächenbereiche zur Anhaftung von Zellspuren (14a, 14b, 34, 44) eingerichtet sind, die aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen.

18. Vorrichtung gemäß Anspruch 17, bei der das Substrat in den Oberflächenbereichen (12, 52, 72) und/oder den Bahn-Oberflächenbereichen (13, 15, 17, 35, 45, 55, 57, 77a, 77b) strukturell und/oder chemisch modifiziert ist, um die Anhaftung von Zellspuren zu unterbinden bzw. zu fördern.

19. Vorrichtung gemäß Anspruch 17, bei der das Substrat Teil eines Mikrosystems ist, auf dem die Oberflächenbereiche und die Bahn-Oberflächenbereiche ausgebildet sind, wobei die Bahn-Oberflächenbereiche mindestens eine gerade Bahn bilden.

20. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 17 bis 19, bei dem das Substrat aus Glas, Silizium oder einem Kunststoff besteht.

21. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 17 bis 20, bei der eine Vielzahl von Bahn-Oberflächenbereichen in Form einer Gruppe paralleler Bahnen (57) oder sich kreuzender Bahnen (77a, 77b) gebildet sind.

22. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 17 bis 21, bei dem das Substrat zweiteilig ist, wobei die Bahn-Oberflächenbereiche auf einem der Substratteile angeordnet sind.

23. Verfahren zur zellspurbasierten Kultivierung biologischer Zellen, bei dem die Zellen (16) auf ein zumindest teilweise strukturiertes und/oder oberflächenmodifiziertes Substrat (11) aufgebracht werden und sich adhärent über die Oberfläche des Substrats unter Erzeugung von Zellspuren (14a, 14b) bewegen, die aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen, und auf den Zellspuren eine Kultivierung von Zellen gleichen oder andersartigen Typs durchgeführt wird.

24. Verfahren gemäß Anspruch 24, bei dem die biologischen Zellen gewebeerzeugende Zellen und das Substrat ein Implantatmaterial umfassen.

25. Verwendung von Materialrückständen, die von biologischen Zellen auf Substraten gebildet sind, zur Untersuchung von Eigenschaften der Zellen für medizinische, biochemische und/oder pharmakologische Zwecke, oder zur biokompatiblen Modifizierung der Oberflächen von Implantatmaterialien.

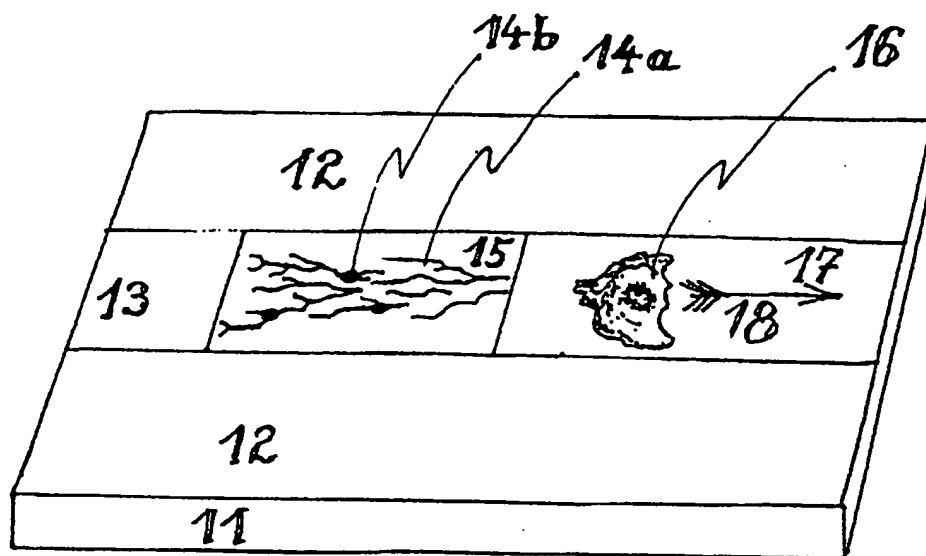


Fig. 1

2/6

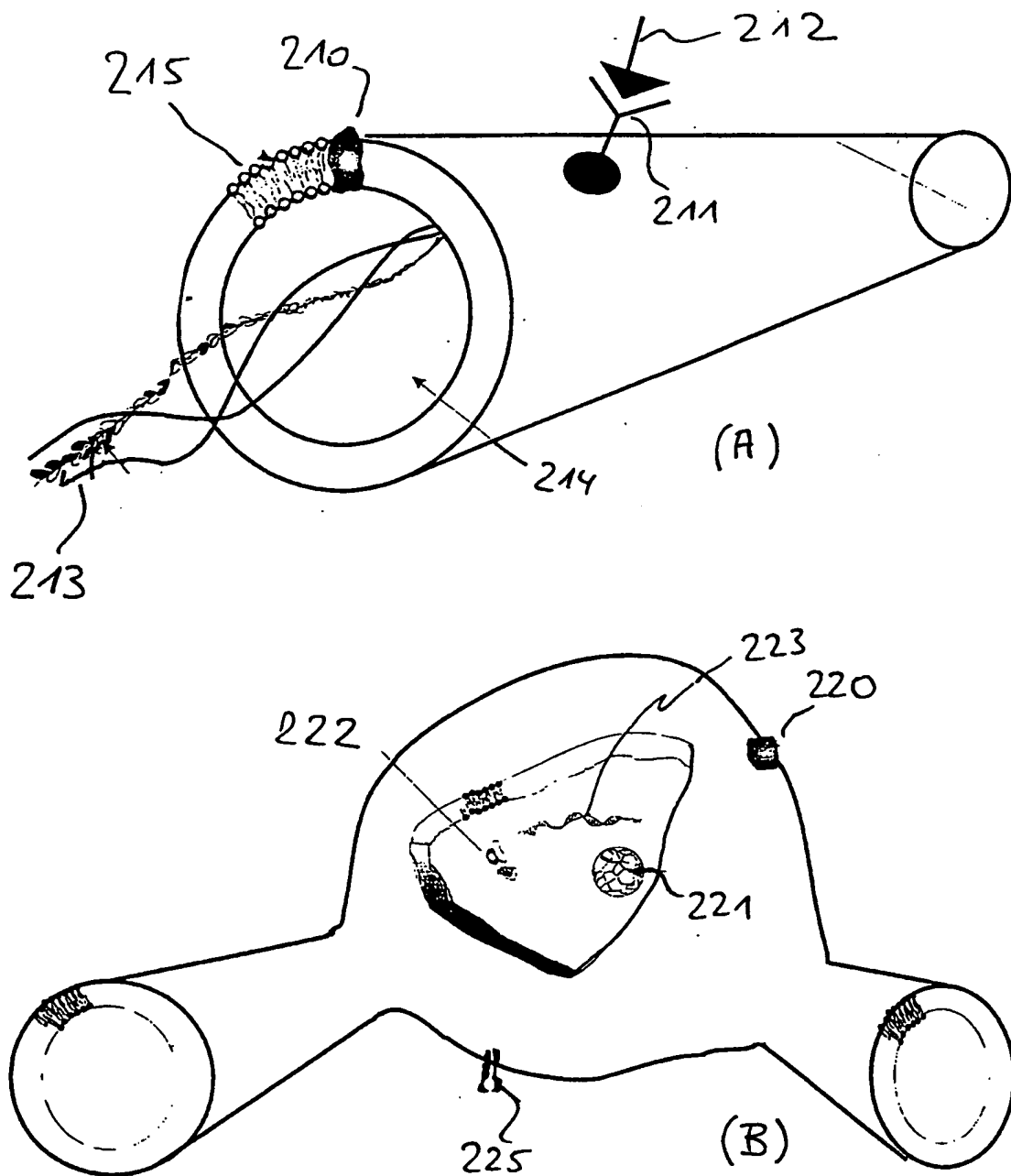


Fig. 2

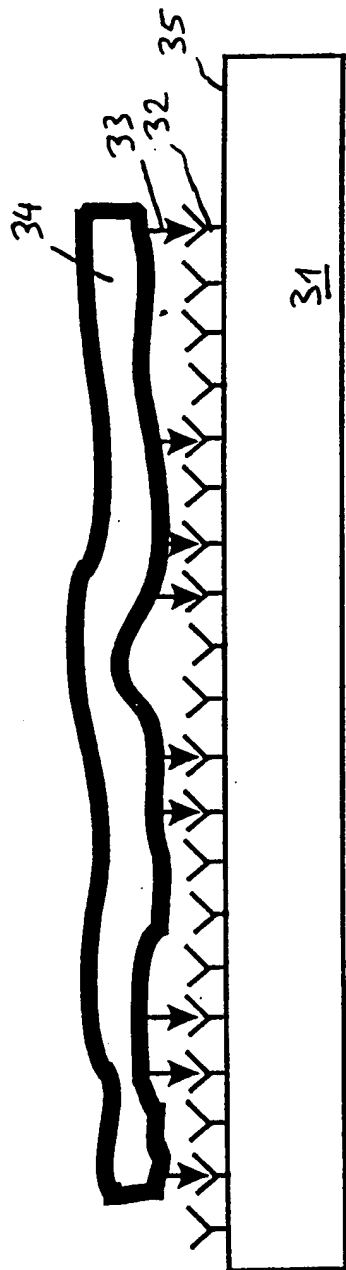


Fig. 3

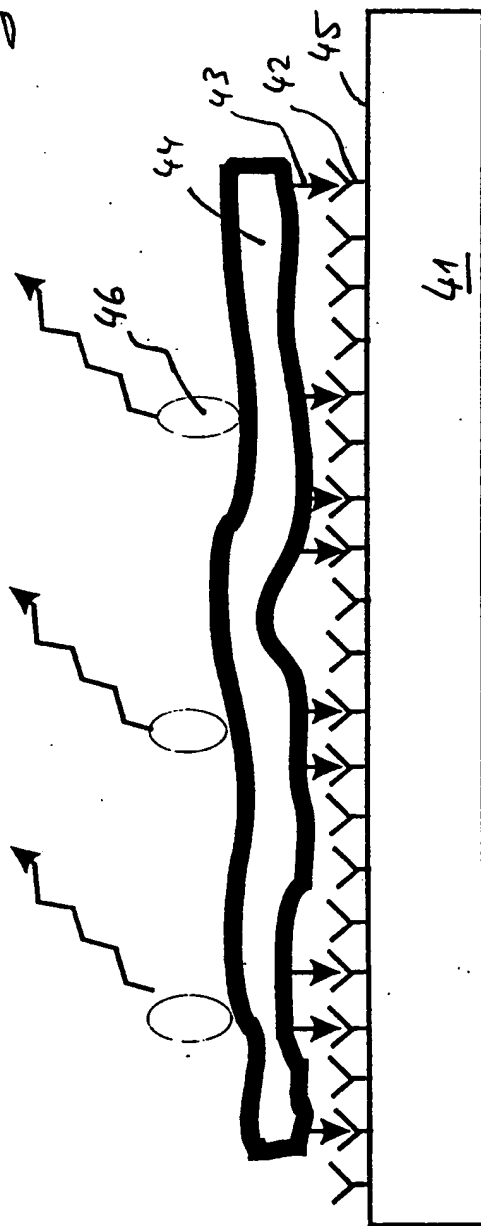


Fig. 4

4/6

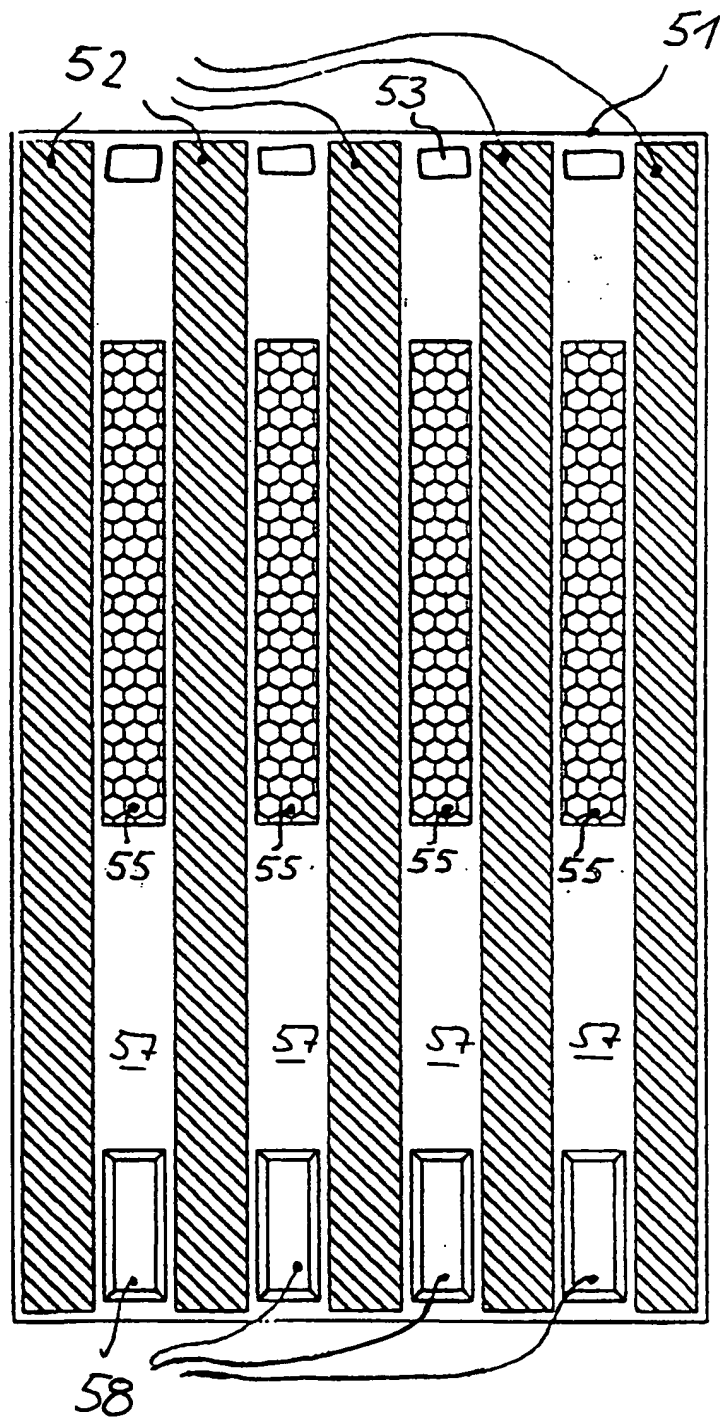


Fig. 5

5/6

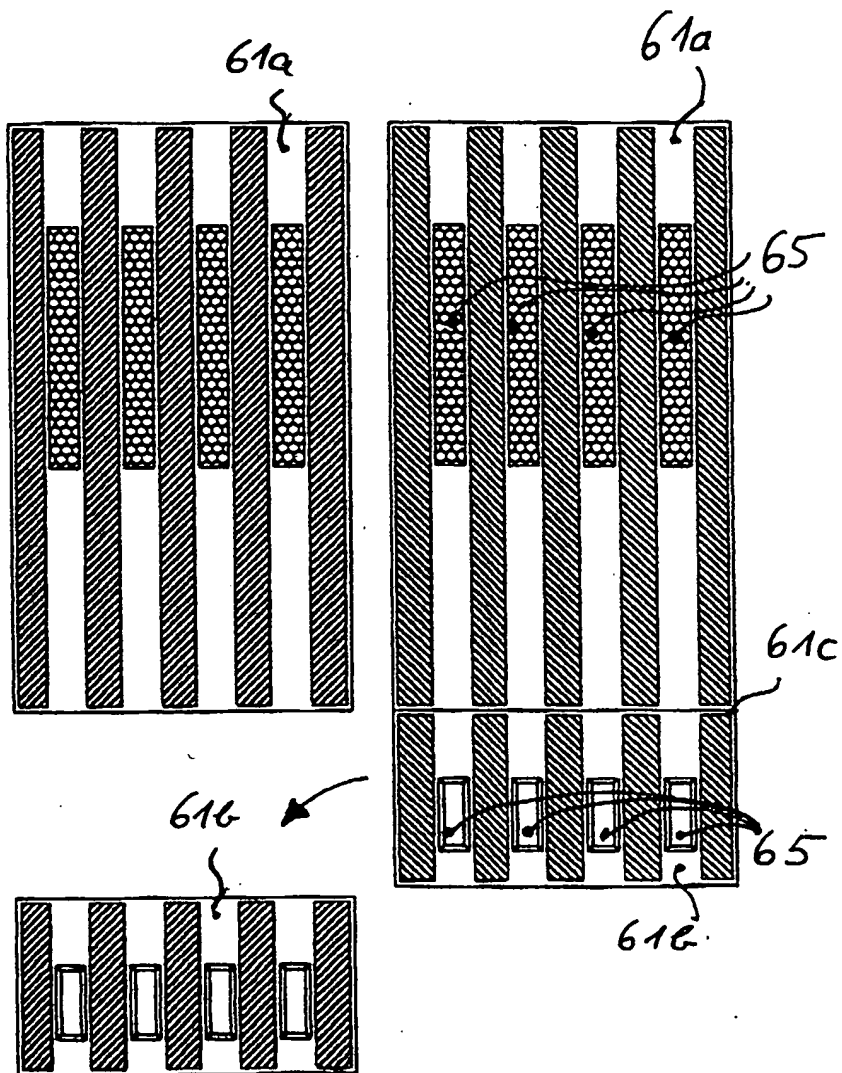


Fig. 6

6/6

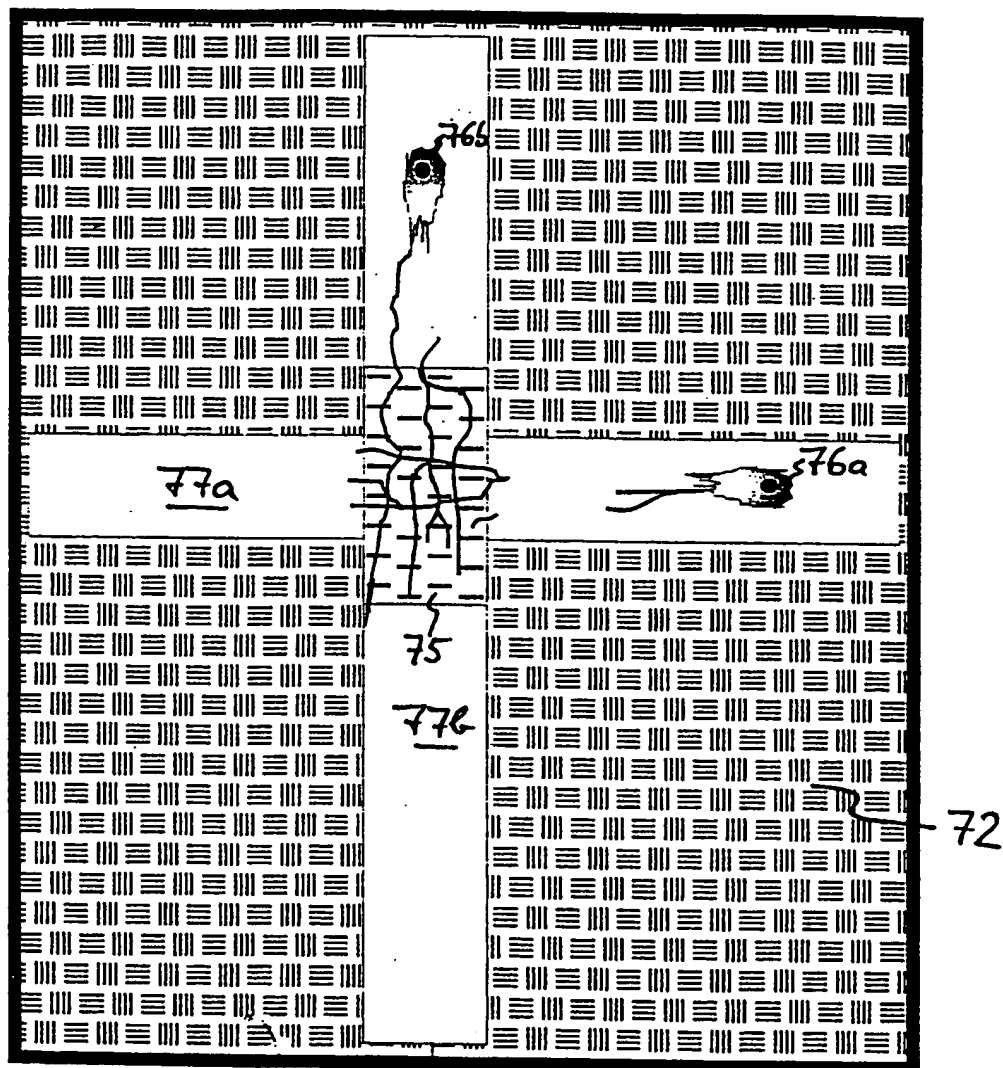


Fig. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/09781

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/483 C12N5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 359 527 A (ZETTER BRUCE R) 16 November 1982 (1982-11-16) column 1, line 64 -column 2, line 8	1,2
Y	----	4,5,13, 17-20
Y	EP 0 347 210 A (BECTON DICKINSON CO) 20 December 1989 (1989-12-20) page 1, line 52 -page 2, line 4	4,5
X	FR 2 743 421 A (AETSRN) 11 July 1997 (1997-07-11) page 2, line 30 -page 3, line 8 claim 1 ----- -/--	1,2,7

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 March 2000

Date of mailing of the international search report

28/03/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Krametz, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. Application No

PCT/EP 99/09781

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 96 15223 A (UNIV LOUVAIN ; DEWEZ JEAN LUC (BE); LHOEST JEAN BENOIT (BE); DETRAI) 23 May 1996 (1996-05-23) page 3, line 20 - page 7, line 17 figure 1	13, 17-20
A	-----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/09781

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4359527	A	16-11-1982	NONE	
EP 0347210	A	20-12-1989	US 5047321 A	10-09-1991
			AT 111227 T	15-09-1994
			AU 613197 B	25-07-1991
			AU 3596189 A	21-12-1989
			CA 1340170 A	08-12-1998
			DE 68918004 D	13-10-1994
			DE 68918004 T	05-01-1995
			DK 296889 A	16-12-1989
			ES 2063820 T	16-01-1995
			FI 892926 A,B,	16-12-1989
			JP 2009578 C	02-02-1996
			JP 2073157 A	13-03-1990
			JP 7026954 B	29-03-1995
			NO 175506 B	11-07-1994
FR 2743421	A	11-07-1997	AU 1383197 A	01-08-1997
			EP 0879414 A	25-11-1998
			WO 9725617 A	17-07-1997
WO 9615223	A	23-05-1996	BE 1008955 A	01-10-1996
			EP 0800574 A	15-10-1997
			US 5962136 A	05-10-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/09781

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N33/483 C12N5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 4 359 527 A (ZETTER BRUCE R) 16. November 1982 (1982-11-16) Spalte 1, Zeile 64 - Spalte 2, Zeile 8	1,2
Y	---	4,5,13, 17-20
Y	EP 0 347 210 A (BECTON DICKINSON CO) 20. Dezember 1989 (1989-12-20) Seite 1, Zeile 52 - Seite 2, Zeile 4	4,5
X	FR 2 743 421 A (AETSRN) 11. Juli 1997 (1997-07-11) Seite 2, Zeile 30 - Seite 3, Zeile 8 Anspruch 1	1,2,7

	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. März 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

28/03/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Krametz, E

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/09781

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 96 15223 A (UNIV LOUVAIN ; DEWEZ JEAN LUC (BE); LHOEST JEAN BENOIT (BE); DETRAI) 23. Mai 1996 (1996-05-23) Seite 3, Zeile 20 -Seite 7, Zeile 17 Abbildung 1	13,17-20
A		1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/09781

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 4359527 A	16-11-1982	KEINE	
EP 0347210 A	20-12-1989	US 5047321 A	10-09-1991
		AT 111227 T	15-09-1994
		AU 613197 B	25-07-1991
		AU 3596189 A	21-12-1989
		CA 1340170 A	08-12-1998
		DE 68918004 D	13-10-1994
		DE 68918004 T	05-01-1995
		DK 296889 A	16-12-1989
		ES 2063820 T	16-01-1995
		FI 892926 A,B,	16-12-1989
		JP 2009578 C	02-02-1996
		JP 2073157 A	13-03-1990
		JP 7026954 B	29-03-1995
		NO 175506 B	11-07-1994
FR 2743421 A	11-07-1997	AU 1383197 A	01-08-1997
		EP 0879414 A	25-11-1998
		WO 9725617 A	17-07-1997
WO 9615223 A	23-05-1996	BE 1008955 A	01-10-1996
		EP 0800574 A	15-10-1997
		US 5962136 A	05-10-1999

METHOD AND DEVICE FOR THE CELL-TRACK-BASED EXAMINATION AND
CULTIVATION OF CELLS

Günter Fuhr et al.

INTERNATIONAL PATENT OFFICE
WORLD ORGANIZATION FOR INTELLECTUAL PROPERTY

International patent published on
the basis of the Patent Cooperation Treaty

INTERNATIONAL PUBLICATION NO. WO 00/36415

International Patent Classification ⁷ :	G 01 N 33/483 C 12 N 5/00
International Filing No.:	PCT/EP99/09781
International Filing Date:	December 10, 1999
International Publication Date:	June 22, 2000
Priority	
Date:	December 14, 1998
Country:	DE
No.:	198 57 692.7

METHOD AND DEVICE FOR THE CELL-TRACK-BASED EXAMINATION
AND CULTIVATION OF CELLS

[Verfahren und Vorrichtung zur zellspurbasierten Zelluntersuchung und Zellkultivierung]

Inventors; and Inventor/Applicants (only for US):	Günter Fuhr et al.
Applicant (for all designated states except US):	Evotec Biosystems AG [DE/DE]
Designated States:	JP, US, European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)
Published	
With International Search Report.	

FOR INFORMATION ONLY

Codes for the identification of PCT contract states on the cover sheets of the documents that publish the international applications in accordance with the PCT.

AL	Albania	LU	Luxembourg
AM	Armenia	LV	Latvia
AT	Austria	MC	Monaco
AU	Australia	MD	Republic of Moldavia
AZ	Azerbaijan	MG	Madagascar
BA	Bosnia-Herzegovina	MK	Macedonia (former Yugoslavian Republic of Macedonia)
BB	Barbados		
BE	Belgium	ML	Mali
BF	Burkina Faso	MN	Mongolia
BG	Bulgaria	MR	Mauritania
BJ	Benin	MW	Malawi
BR	Brazil	MX	Mexico
BY	Belarus	NE	Niger
CA	Canada	NL	Netherlands
CF	Central African Republic	NO	Norway
CG	Congo	NZ	New Zealand
CH	Switzerland	PL	Poland
CI	Côte d'Ivoire	PT	Portugal
CM	Cameroon	RO	Romania
CN	China	RU	Russian Federation
CU	Cuba	SD	Sudan
CZ	Czech Republic	SE	Sweden
DE	Germany	SG	Singapore
DK	Denmark	SI	Slovenia
EE	Estonia	SK	Slovakia
ES	Spain	SN	Senegal
FI	Finland	SZ	Swaziland
FR	France	TD	Chad
GA	Gabon	TG	Togo
GB	United Kingdom	TJ	Tajikistan
GE	Georgia	TM	Turkmenistan
GH	Ghana	TR	Turkey
GN	Guinea	TT	Trinidad and Tobago
GR	Greece	UA	Ukraine
HU	Hungary	UG	Uganda
IE	Ireland	US	United States of America
IL	Israel	UZ	Uzbekistan
IS	Iceland	VN	Vietnam
IT	Italy	YU	Yugoslavia
JP	Japan	ZW	Zimbabwe
KE	Kenya		
KG	Kyrgyzstan		
KP	Democratic People's Republic of Korea		
KR	Republic of Korea		
KZ	Kazakhstan		
LC	Saint Lucia		
LI	Liechtenstein		
LK	Sri Lanka		
LR	Liberia		
LS	Lesotho		
LT	Lithuania		

The invention relates to methods and devices for the examination of cells, in particular to cell assays or cell test arrangements, their manufacture and methods for their use. The invention also relates to uses of cell tracks on substrate surfaces.

/1*

Cell-based assays (reaction preparations, test preparations and similar preparations) assume a key position in pharmacology, toxicology and medicinal diagnostics. The goal is to find examination and detection methods which can be rapidly carried out and are highly specific, for biological cells themselves or for their interactions with other cells or with natural or synthetic foreign substances. In addition, it would be desirable, if the cells used for the detection of a substance, a cell type, a drug effect, etc., were reusable, (that is still capable of being cultured). In the medicinal area this means, for example, the return into the donor organism (for example, a patient) or of another human recipient. However, such procedures not only require sterility, there are also very stringent requirements that the cell properties not be changed by the examination or analysis. Thus, labeling (for example, for the generation of fluorescence), as used in immunofluorochromation, is ruled out, because the subsequent reactions of cells which have been contaminated in this way, in a subsequent cultivation or in the recipient organism can only be evaluated with difficulty.

Furthermore, it is advantageous to be able to carry out cell examinations specifically on individual cells. For a statistically corroborated examination result, a sufficiently high number of individual cells must be examined. Consequently, there is a need for parallel examinations, which to date are not available, to be carried out on a multitude of individual cells under conditions which are as identical as possible.

/2

The problem of the invention consists in developing extremely inexpensive methods, which can also be used in the medical area, as well as devices for cell examination, which are combined with as large a number as possible of already proven highly specific detection techniques, such as, for example, immunofluorochromation of proteins, nucleotides and lipids, as well as destructive methods, such as, for example, X-ray or electron beam microanalysis, and which allow the parallel examination of a multitude of individual cells. The problem of the invention also consists in indicating new applications of cell tracks.

This problem is solved by methods and devices having the characteristics according to Claims 1 and 17, respectively. Advantageous embodiments and uses of the invention can be obtained from the dependent claims.

The fundamental idea of the invention in particular consists first in generating on a substrate surface, cell tracks of the cells to be examined, for the examination or cultivation of biological cells or their interactions with other cells or substances, and then in subjecting these

* [Numbers in right margin indicate pagination in the original foreign text.]

cell tracks to the desired analysis or examination. The generation of cell tracks by cells which grow in an adhesive manner on surfaces, or moving cells, in itself is known and has been described, for example, by E. D. Hay et al. in *Exp. Biol. Med.*, Vol. 10, 1985, p. 174 ff. The structures and properties of cell tracks are explained with reference to Figures 2 and 3. It is preferred to generate the cell tracks using substrate surfaces which are at least partially microstructured and/or modified in an appropriate manner. The microstructuring of the substrate surface is intended, in particular, to promote the generation of cell tracks in certain substrate areas, for example, along certain lanes, and to prevent or rule out such generation in other substrate areas. Furthermore, the surface modification has the result that it is possible to examine not only the material tracks which remain in a natural manner on the substrate, but also artificially separated material residues (achievement of larger numbers of tracks). For this purpose, substrate modification includes, in particular, the application of molecules which offer binding signs with which a predetermined, sought cell surface molecule can specifically couple.

/3

The examination methods used according to the invention comprise all the techniques which are known for the examination and treatment of cells, where both nondestructive and also destructive techniques or, optionally, biochemical amplification techniques (for example, PCR process) can be used.

Another object of the invention is the use of cell tracks for manipulating the interaction of biological cells with solid substrates. By a targeted application of cell tracks to synthetic or biological substrates in accordance with the principles explained in the present description, biocompatible carriers are prepared for the biological cells to be manipulated. The manipulation consists, in particular, of the targeted cell cultivation (tissue construction) on the substrate areas covered with cell tracks.

The substrate surfaces used according to the invention can also consist of synthetic, inorganic or organic material, or even of biological material (bone material).

The invention has the following advantages. For the first time, a single cell specific method for examining cells is provided, in which the cell which is examined by the examination process remains uninfluenced and unchanged. This allows a considerable broadening of the range of application of individual cell examinations in pharmacology, toxicology, medicinal diagnostics and biochemistry. The cell examination can be carried out to a high degree in parallel on a multitude of cells by the simultaneous generation of many tracks on a substrate. Because the microstructuring of the surfaces allows the assignment of a cell track to an examined cell (donor cell), the highly parallel examination of individual cells also remains cell specific. The microstructuring of the substrate surface can preferably be carried out using techniques which are known from semiconductor processing.

/4

According to the invention, the cells are not exposed to any staining or labeling techniques besides the track generation. Thus, they are not contaminated or changed thereby, and they can be used for a medical purpose, in cryopreservation or in an additional cultivation. Instead of subjecting the cells to a specific labeling or evaluation, as in the past, it is the cell residues that are subjected to a specific labeling or evaluation. It is entirely possible for these processes to be also destructive (for example, stepwise enzymatic degradation) or to be carried out via immunofluorochromation in toxic concentration ranges.

The cell cultivation according to the invention has the advantage that by means of the cell tracks, any substrate materials can be made biocompatible, for example, materials that are of interest for the implantation of bone materials. Novel substrates for in vitro tissue generation are produced, which have a considerably broadened range of application. By the cell-track-based modification of substrate surfaces, it is possible to apply, as a function of the application, optimized cell cultures on optimized substrate materials, which may not be compatible with each other without the cell tracks.

/5

Additional embodiment examples and advantages of the invention are described below with reference to the drawings in the appendix. In the drawings

Figure 1 shows the principle of the construction of a cell-track-based system according to the invention (detail),

Figure 2 shows a schematic illustration of the fundamental structures of cell tracks in the form of filaments (A) and membrane patches (B),

Figure 3 shows an illustration of the mechanism of action of a modified substrate,

Figure 4 shows an illustration concerning the examination according to the invention of the fluorescence of cell tracks,

Figure 5 shows an embodiment example of the invention, in which the fundamental principle which is illustrated in Figure 4 is carried out with a multitude of parallel cell lanes,

Figure 6 shows an additional embodiment example of the invention with a multitude of parallel cell lanes, and

Figure 7 shows an additional embodiment example of the invention with intersecting cell lanes.

Figure 1 is a representation of the principle of the construction of a cell-track-based system according to the invention. A substrate 11 is structured in its surface, in the μm and mm range, as discussed below, or its surface properties are changed.

By means of areas 12 of the surface, to which the cells can only adhere with difficulty, and areas 13, 15, 17 (lane surface areas), where the cells can adhere well, a preferred lane is formed, on which a cell 16 can actively move. The field 15 in the lane surface area has been modified in such a manner (chemically, mechanically, etc.), that the cells here lose parts of their

/6

membrane and internal components 14a, 14b, which adhere to the substrate. In the depicted example, the parts are filaments 14a and membrane spots (or membrane patches) 14b, which are individually explained below with reference to Figures 2A and 2B. The cell continues to move in the direction of the arrow 18. The cell track can now be analyzed in a nondestructive or in a destructive manner. The material which has been left characterizes the donor cell with regard to membrane composition (receptors, carrier, lipids, etc.), but also with regard to the internal components of the cytoplasm, which makes it possible to produce medicinal, toxicological, pharmacological and other applications. Along one lane, it is possible for one or more cells to move and generate tracks.

The substrate 11 consists, for example, of glass, mica, inorganic crystal material or semiconductor material. The substrate surface is structured or modified, on the one hand, to form the preferred lane on which the cell preferentially moves, and leaves cell tracks. The surface areas 12, to which the cells can only adhere with difficulty, carry, for example, a coating with negatively charged molecules, preferentially consisting of polymers with as many OH⁻ groups, such as, for example, poly-HEMA, as possible. Below, examples are indicated for influencing the areas 13, 15, 17, in which the cells can adhere well. On the other hand, the microstructuring and/or modification of the substrate surface comprises a locally selective influencing of the preferred lane between the areas 12 of the substrate surface. The segmenting of the preferred lane, for example, into the areas 13, 15 and 17, is provided for the purpose that, depending on the shape of the individual area, the cell tracks are left in particularly large or particularly small numbers, or they are left as a function of a certain composition. This is also apparent from the examples which are explained below.

/7

The microstructuring or modification of the preferred lane comprises, for example:

1. The application of molecular, cell contact increasing, layers (for example, fibronectin, polylysine, alginates, etc.). The layer thickness can be chosen, depending on the application, in the range from the thickness of one molecular layer up to the micrometer range. The molecular monolayers are preferably applied using the Langmuir-Blodgett technique. In general, one can also use thick layer techniques and/or plasma treatments for the layer application.
2. The nano- or microstructuring of surfaces, that is the application of patterns having nm or μm dimensions, to which membrane parts, and in particular, natural contact molecules of the cell, such as those belonging to the integrin and catherin family, can adhere (for example, structuring using photo or electron beam lithography).
3. Submicrometer or atomic roughening or relief formation on the surface (ultras-small hooks, etc.).

The substrate coating (application of the cells) is carried out, for example, by rinsing from a suspension, for example, through a channel of the microsystem, with a manipulator (capillary, separate microsystem or optical tweezers), or also by active cultivation.

During the migration of the cells over the substrate surfaces (for example, over a clean glass surface), the cells leave, under physiological conditions, filamentous or patchy tracks, which hereafter are referred to as filament or membrane patch, and which are explained with reference to Figures 2A and 2B, respectively. As a rule, the tracks are structures which are enveloped in membrane and filled with cell contents. Typical sizes of these structures, with regard to the width and the height, are in the μm and sub- μm range. While the length of a membrane spot as a rule substantially corresponds to its width, the length of a filament is variable. The filament length can be up to several millimeters. The components of interest of the cells, which can also be found in the cell tracks, are membrane proteins 210, surface proteins and receptors 211, 212, cytoplasm components 213, 214 and the lipids 215 in the membrane (see Figure 2A). Membrane patches can not only contain the above components which, for example in Figure 2B, comprise the membrane proteins 220 and the lipid composition 225, they can also contain vesicles 211, organelles 222 and genetic material 223. In addition, cytoplasm 224 is also present. In the context of the present invention, it was observed, for the first time, that the cell tracks contain sufficient quantities of analyzable material, comprising, among other components, the mentioned components. This means that the analysis or examination methods which in themselves are known can be implemented advantageously without separate enrichment steps.

/8

The surface proteins and receptors 211, 212 comprise, for example, a track protein 211 in the membrane and a coupled receptor 212 with a chromophore group. If appropriately excited by light, the receptor 212 emits fluorescence light which indicates the presence of the track protein 211. Because the receptor coupling occurs with protein specificity, it is possible to detect the protein complex which is present in the track from the fluorescence light.

Analogously, it is also possible to implement other detection techniques, such as those provided, for example, in ELISA and RIA assays.

/9

According to the invention, the specific detection of certain components of the donor cell thus occurs on the cell tracks. The components can be arranged on the surface or in the interior of the cell tracks. In the latter case, it is provided to dissolve the membrane of the cell track using appropriate solvents or to permeate them mechanically or electrically. The destructive measurement on the cell tracks without modification of the donor cell for the determination of molecular or microscopic components in the cell tracks represents a special advantage of the invention.

The cell-track-based analyses are especially suited for combination with highly sensitive measurement techniques. The latter comprise, for example, fluorescence correlation analysis for

the detection of individual molecules and for the detection of binding constants, mass spectrometry for elemental analysis, and confocal laser scanning microscopy. Genetic material in the tracks can be amplified, for example, using a PCR process, resulting in a novel technique for genetic analysis which does not influence the donor cell in its physiological cells.

For individual cell based assays and detection methods, it is also possible to use the following procedures.

1. The quantity of cell residues is determined as a quantitative measure of the strength of the adhesion of the donor cell to the substrate surface and thus of the quantity of certain binding complexes in their membrane.

2. The track structure is determined as a measure, for example, the ratios of the proportion of filaments to the proportion of branches, the proportion of patches, etc. (comparison of the quantity of fundamental elements of the cell track).

/10

3. The material composition of the tracks is determined, for example, as a measurement of lipid/protein proportion, specific occurrence of certain receptors (including receptors of the immunoglobulin families), specific occurrence of lipids, nucleotides, etc.

4. Characterization of cytoplasmic residues, in particular of genetic material in the residues of the cells.

5. Comparison of changes in one of points 1 to 4 after the treatment of the track generating cell (for example, with pharmaceuticals, toxic substances, etc.).

6. The stability of the track against mechanical, electrical, acoustic, optical or chemical treatments is determined as a measurement.

7. The elemental composition of the tracks or parts thereof (for example, Na, K, P...) are determined as measurement.

8. Passive electric parameters of the cell residues, such as impedance, rupture strength, nonlinear behavior or heating are determined as a measure.

9. Optical parameters of the tracks are determined such as absorption, transmission, nonlinear properties, etc are determined as measurements.

10. Mechanical properties of the tracks, such as elasticity, plasticity, etc., are determined as a measurement.

11. The change of a cell track by a following cell of the same type or of a different type is determined as a measurement.

/11

12. The track characterization is carried out after a fixation or contrast production, for example, by means of a high resolution microscopic method (scanning electron microscopy, AFM, SNOM, etc.).

13. A negative or another duplicate or a multiplication of track parts, as in the PCR technique, is used as a measurement for the comparison.

14. The adhesion of other materials, such as highly specific binding beads or nm particles, are [sic; is] determined as a measurement for the comparison.

The measurements which are mentioned here are determined as magnitudes which are specific for the donor cells, and which are used, in the case of existing comparative values, for a characterization of the donor cell or, in the case of a comparison of the measures with the corresponding results for other cells, for the characterization of the difference in the behavior of the cells.

Below, embodiments of devices according to the invention are explained with reference to Figures 3-7. In the process, details of the substrate surfaces which are used according to the invention are presented. No details of an overall apparatus for the examination of cell tracks are shown, because they in themselves are known with reference to the handling of assays or of substrates which are covered with samples, and to the adaptation to the examination methods which are desired in each case.

Figures 3 and 4 are schematic cross sections of substrates 31, 41, which are each provided with a modification layer 32 and 42 in the lane surface area 35 and 45, respectively, for the preferential adhesion of cells and for leaving the cell tracks 34 and 44, respectively. The modification layer 32 (or 42) presents binding sites with which a predetermined, sought cell surface molecule 33 (or 43) can specifically couple. A cell which has such molecules in sufficient number, will be bound accordingly more firmly and it will leave more track material 34 (or 44) during its migration over the substrate than other cell types. The determination of the quantity of the material which has been left (for example, by optical means) provides an indication of the content of the predetermined cell surface molecule on the examined cell. The cell itself is not negatively affected by the measurement.

/12

If the quantity of the cell track material is too low for a reliable direct evaluation, then the cell track measurement can be modified according to Figure 4. After the generation of the cell tracks 44, the latter are treated with the solution of a fluorescence label, which is incorporated nonspecifically as label molecule 46, for example, in the lipid portions of the cell track 44. Using appropriate excitation by light and fluorescence measurement, it is possible to derive from the intensity of the fluorescence light, the number of the label molecules 46 and thereby the quantitative amount of the cell track material 44.

The preferred lane according to Figure 1 or the modified lane surface area 35 (or 45) according to Figure 3 (or 4) can be formed singly or multiply with the greatest variety of geometries on the substrate. Below, straight preferred lanes are described. However, if the substrate is appropriately structured, curved (for example, circular) preferred lanes are also possible.

Figure 5 shows an example of a parallel embodiment of the fundamental principle explained in Figure 1, with a multitude of parallel, straight preferred lanes.

On a substrate 51, which can consist, for example, of glass, silicon or plastic, materials 52 which present cell adhesion are applied.

/13

As a result, a multitude of lanes 57 (lane surface areas) is formed, on which the cells can move in an adhesive manner. The lanes 57 extend from the input well 53 over the surface fields 55 to the exit well 58. The surface fields 55 are treated in such a manner that cell tracks are preferentially produced. If the cells reach the exit wells 58, which have also been prepared for the adhesion, they are retained there or removed to be subjected to cultivation, cryopreservation or another procedure. The analysis of the track can be carried out with any of the routine microdetection methods (fluorescence, isotope labeling, elemental analysis, etc.). The surface fields 55 with the cell tracks (not shown) are arranged as segments of the lanes 57, forming a row, in each case with the same separation from each input well 53. This allows the parallel, simultaneous evaluation of the cell tracks.

Figure 6 is a substrate surface in the form of a microsystem, which has been compartmentalized into different surface areas, similarly to Figure 5. However, the substrate here consists either of two parts 61a, 61b or of one part with a prescored rupture site 61c. The cells leave tracks on the fields 65. If, in their migration over the substrate, they reach the exit well 68, then the part 61b is removed or broken off. As shown in the left part of Figure 6, the tracks and cells are then in each case on separate substrates 31 and 32, so that they can be subjected to further treatments in different manners.

Analogously to these descriptions, the surfaces can be produced with many more cell paths, in which the parallel tracks of many cells can be generated and characterized, and in such a manner that they can be unequivocally assigned.

/14

Figure 7 shows a substrate surface structured in such a manner that two preferred lanes, which are arranged for the migration of the donor cells, intersect. On the substrate 71, the lanes 77a and 77b run substantially perpendicularly to each other. In the intersection area 75, a surface modification or structuring to promote the adhesion of cell tracks is applied, as was explained above. Outside of the lanes 77a or 77b, the substrate 71 is structured in such a manner that no cell migration takes place there and no cell tracks adhere.

With the arrangement shown in Figure 7, it is possible to examine preferential interactions between different cells. For example, one can provide for the cells 76a to first migrate over the area 75 and leave cell tracks there. Then, the cell 76b migrates over the same area 75 with the existing cell tracks. Using an optical microscopy method or another examination method, one then determines whether the tracks of the first cell 76a have been changed, overlaid or removed by the second cell 76b. Furthermore, one can determine whether geometric

correlations between the cell tracks exist, that is whether the following cells follow the tracks of the preceding cells or just avoid them. From this, it is again possible to develop highly specific cell-based assays for medicine, biotechnology and pharmacology. A substrate with intersecting lanes can again be formed to achieve a parallel processing, in many cases on a single carrier.

The manufacture of a substrate according to the invention is preferably carried out in such a manner that a carrier material is first provided with a coating which does not promote cell migration and adhesion (for example, highly negatively charged molecules). Subsequently, this coating is structured in accordance with the desired course of the preferred lanes by abrasion, so that carrier material forming certain geometric shapes is uncovered, and then forms the preferred lanes. Subsequently, depending on the application, the segmenting of the preferred lane is carried out, namely by the application of a structuring and/or modification of the carrier material for increased cell adhesion.

/15

The lane widths are preferably adapted to the characteristic size of an adhering cell and they are approximately 50 μm . The lane lengths can also be chosen as a function of the application. They range, for example, from 3-4 characteristic cell diameters (that is approximately 150-200 μm) to greater lengths in the millimeter range.

According to an additional embodiment of the invention, cell tracks are applied to substrates for cell cultivation. As substrates, one uses flat or, depending on the application, curved solid materials of synthetic or biological origin. For example, glass, ceramic or plastic materials or also polished osseous disks are used as substrate. To provide each substrate surface with a biocompatible coating according to the above explained principles, tissue generating cells, such as, for example, chondrocytes, osteoplasts or epithelial cells are applied on the cell surfaces, to migrate on the latter while leaving back cell tracks. The substrate surface can be structured or otherwise modified (see above) for the application of cell tracks which are as large as possible. After the formation of a closed cell track surface, tissue is generated on the modified substrate. Tissue generating cells, which are preferably of the type with which the cell tracks are generated, are cultured on the modified substrate. A substrate with cultured tissue cells is then used, depending on the application, as an implant in the human body.

/16

Claims

/17

1. Method for the cell-track-based examination of biological cells, in which the cells (16,76a,76b) are applied to an at least partially structured and/or surface modified substrate (11,31,41,51,61,71), and move in an adhesive manner over the lane surface area (13,15,17,35,45,55,57,77a,77b) of the substrate while generating cell tracks (14a,14b,34,44), which consist of material residues which have separated from the cells, and examinations of cells are carried out on the cell tracks.

correlations between the cell tracks exist, that is whether the following cells follow the tracks of the preceding cells or just avoid them. From this, it is again possible to develop highly specific cell-based assays for medicine, biotechnology and pharmacology. A substrate with intersecting lanes can again be formed to achieve a parallel processing, in many cases on a single carrier.

The manufacture of a substrate according to the invention is preferably carried out in such a manner that a carrier material is first provided with a coating which does not promote cell migration and adhesion (for example, highly negatively charged molecules). Subsequently, this coating is structured in accordance with the desired course of the preferred lanes by abrasion, so that carrier material forming certain geometric shapes is uncovered, and then forms the preferred lanes. Subsequently, depending on the application, the segmenting of the preferred lane is carried out, namely by the application of a structuring and/or modification of the carrier material for increased cell adhesion.

The lane widths are preferably adapted to the characteristic size of an adhering cell and they are approximately 50 μm . The lane lengths can also be chosen as a function of the application. They range, for example, from 3-4 characteristic cell diameters (that is approximately 150-200 μm) to greater lengths in the millimeter range.

According to an additional embodiment of the invention, cell tracks are applied to substrates for cell cultivation. As substrates, one uses flat or, depending on the application, curved solid materials of synthetic or biological origin. For example, glass, ceramic or plastic materials or also polished osseous disks are used as substrate. To provide each substrate surface with a biocompatible coating according to the above explained principles, tissue generating cells, such as, for example, chondrocytes, osteoplasts or epithelial cells are applied on the cell surfaces, to migrate on the latter while leaving back cell tracks. The substrate surface can be structured or otherwise modified (see above) for the application of cell tracks which are as large as possible. After the formation of a closed cell track surface, tissue is generated on the modified substrate. Tissue generating cells, which are preferably of the type with which the cell tracks are generated, are cultured on the modified substrate. A substrate with cultured tissue cells is then used, depending on the application, as an implant in the human body.

Claims

1. Method for the cell-track-based examination of biological cells, in which the cells (16,76a,76b) are applied to an at least partially structured and/or surface modified substrate (11,31,41,51,61,71), and move in an adhesive manner over the lane surface area (13,15,17,35,45,55,57,77a,77b) of the substrate while generating cell tracks (14a,14b,34,44), which consist of material residues which have separated from the cells, and examinations of cells are carried out on the cell tracks.

2. Method according to Claim 1, in which, for the examination of cells, the quantity, the geometry, the chemical composition, the passive electrical parameters and/or mechanical properties of the cell tracks or of their components are determined.

3. Method according to Claim 2, in which filaments (14a) and membrane patches (14b) are determined for the determination of the quantity and geometry of the cell tracks.

4. Method according to Claim 2, in which, for the determination of the composition of the cell tracks, the latter are subjected to a staining or labeling for carrying out microanalytical methods.

5. Method according to Claim 4, in which the microanalytical methods comprise fluorescence measurements, measurements based on isotope labeling or elemental analyses.

6. Method according to Claim 2, in which, for the determination of the composition of the cell tracks, the latter are subjected to an enzymatic degradation. /18

7. Method according to Claim 2, in which the cell tracks are examined with a high resolution microscopic method.

8. Method according to Claim 2, in which cytoplasmic residues or genetic materials in the cell tracks are determined.

9. Method according to Claim 2, in which the stability of the cell tracks in case of mechanical, electrical, acoustic, optical and/or chemical treatments, is determined.

10. Method according to Claim 2, in which for the determination of the passive electrical parameters of the cell tracks, their impedance, rupture strength, nonlinear behavior and/or heating due to the current flow are determined.

11. Method according to Claim 2, in which, for the determination of mechanical properties of the cell tracks, their elasticity or plasticity is determined.

12. Method according to one of the preceding claims, in which a multiplication of components of the cell tracks is carried out for the generation of reference material.

13. Method according to one of the preceding claims, in which the cell tracks are generated in predetermined lane surface areas (13,15,17,35,45,55,57,77a,77b), which are at least partially microstructured and/or modified for increased adhesion of the cells.

14. Method according to one of the preceding claims, in which the cells, after the generation of the cell tracks, are subjected to a medical or measurement technological use, cryopreservation or another cultivation. /19

15. Method according to one of the preceding claims, in which a multitude of cell tracks is generated and examined on a multitude of parallel lanes.

16. Method according to one of the preceding claims, in which cell tracks are generated on intersecting lanes and, on intersecting areas of intersecting lanes, the mutual interactions of participating cells and/or cell tracks are examined.

17. Device for the cell-track-based examination of biological cells (16,76a,76b) with a substrate (11,31,41,51,61,71) with surface areas (12,52,72), on which the cells adhere more poorly than on lane surface areas (13,15,17,35,45,55,57,77a,77b), on which the cells adhere well and can move in an adhesive manner, where the lane surface areas which consist of material residues which are separated from the cells, are arranged for the adhesion of cell tracks (14a,14b,34,44).

18. Device according to Claim 17, in which the substrate in the surface areas (12,52,72) and/or the lane surface areas (13,15,17,35,45,55,57,77a,77b) is structurally and/or chemically modified to prevent or to promote the adhesion of cell tracks.

19. Device according to Claim 17, in which the substrate is part of a microsystem, on which the surface areas and the lane surface areas are formed, where the lane surface areas form at least one straight lane.

20. Device according to one of Claims 17-19, in which the substrate consists of glass, silicon or a plastic.

/20

21. Device according to one of Claims 17-20, in which a multitude of lane surface areas is formed as a group of parallel lanes (57) or intersecting lanes (77a,77b).

22. Device according to one of Claims 17-21, in which the substrate consists of two parts, where the lane surface areas are arranged on one of the substrate parts.

23. Method for the cell-track-based cultivation of biological cells, in which the cells (16) are applied on at least one partially structured and/or surface modified substrate (11), and they move in an adhesive manner over the surface of the substrate while generating cell tracks (14a,14b), which consist of material residues which have separated from the cells, and on the cell tracks, a cultivation of cells of identical or different type is carried out.

24. Method according to Claim 24, in which the biological cell tissue generating cells and the substrate comprise an implant material.

25. Use of material residues, which are formed from biological cells on substrates, for the examination of properties of the cells for medical, biochemical and/or pharmacological purposes, or for the biocompatible modification of the surfaces of implant materials.

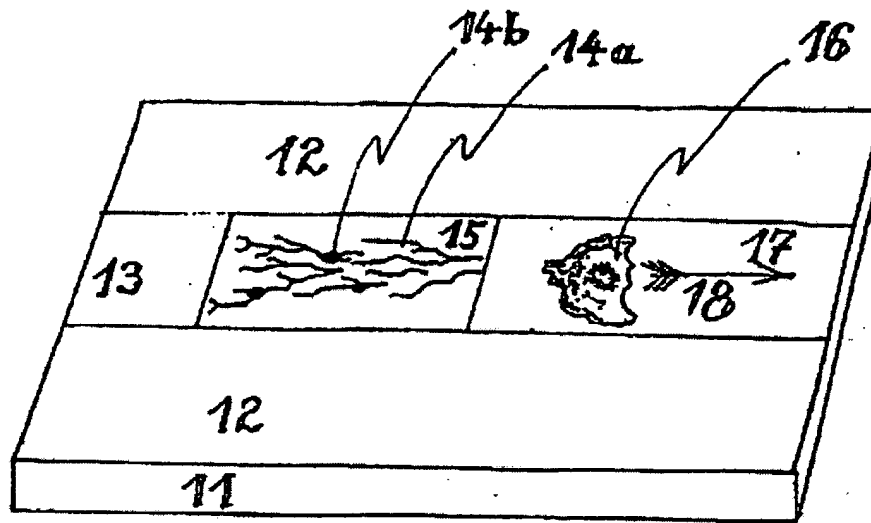


Fig. 1

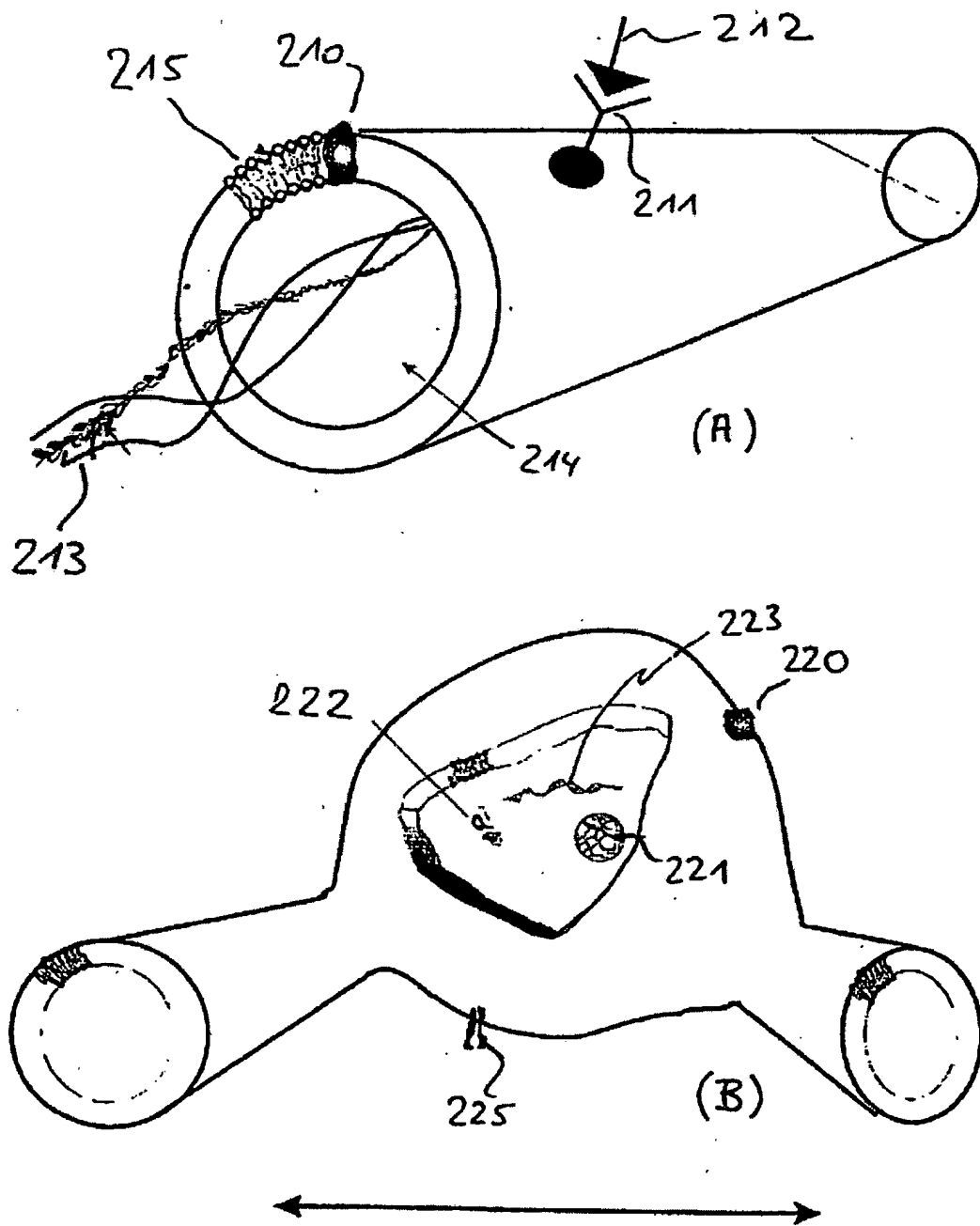
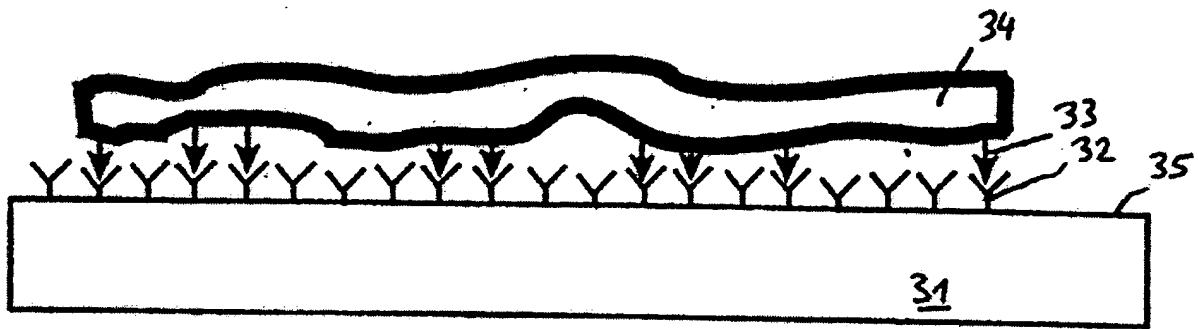
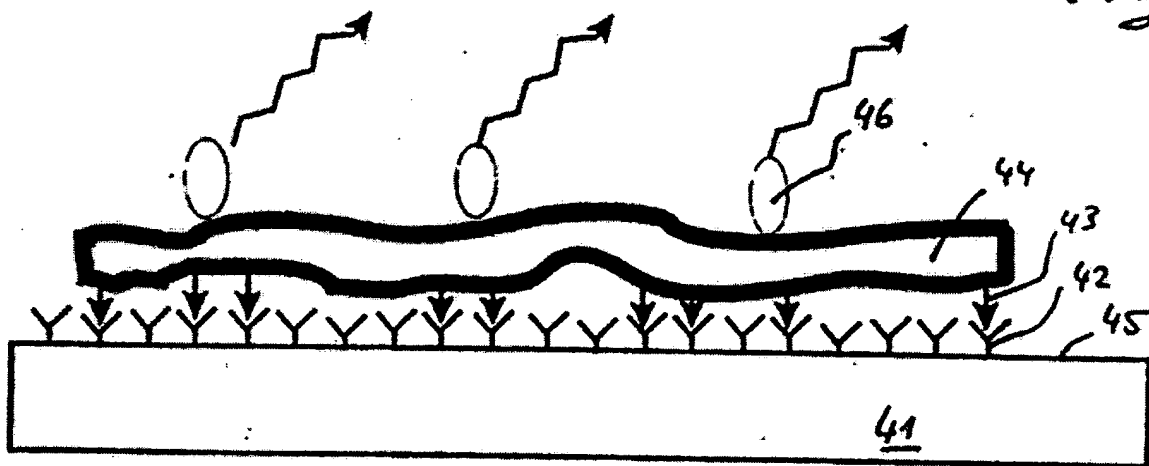


Fig. 2

*Fig. 3**Fig. 4*

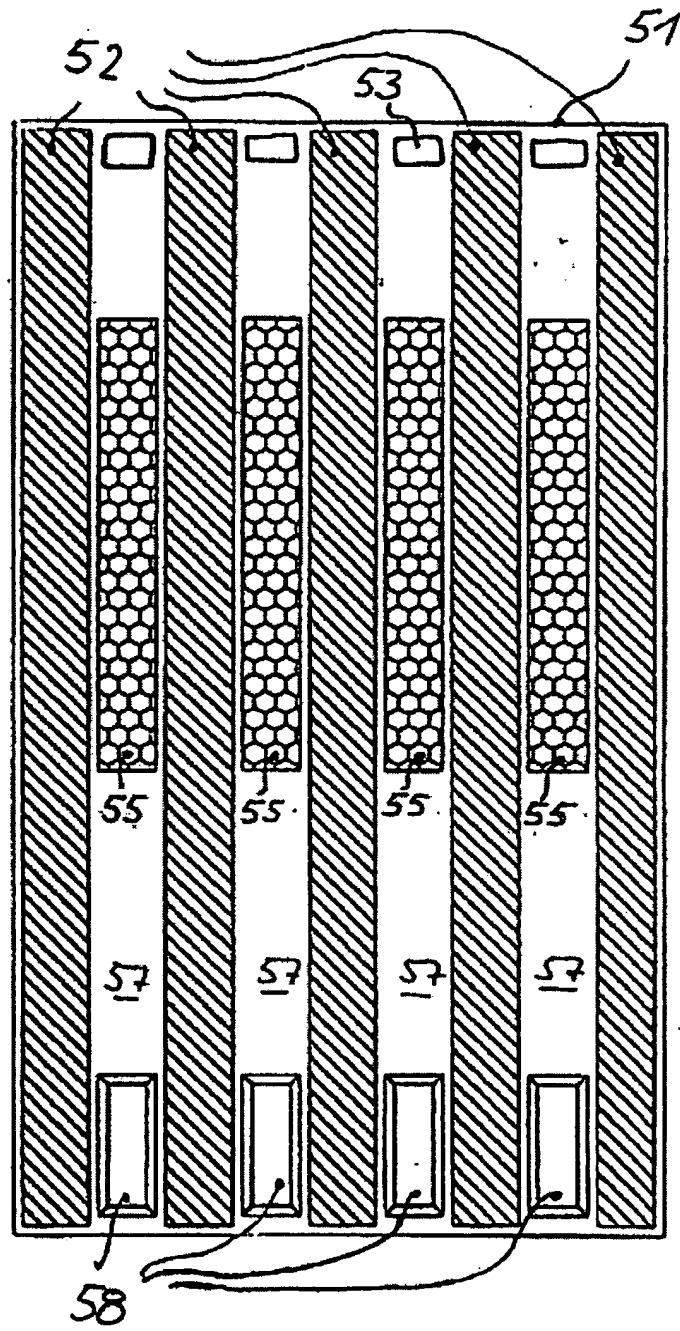


Fig. 5

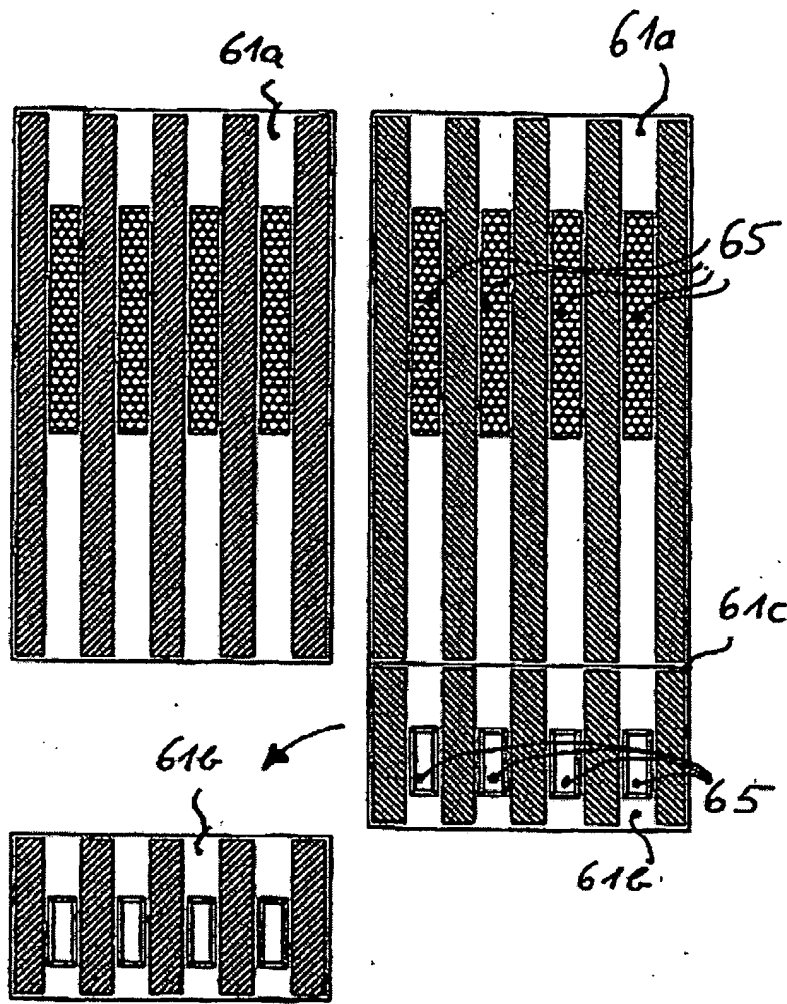
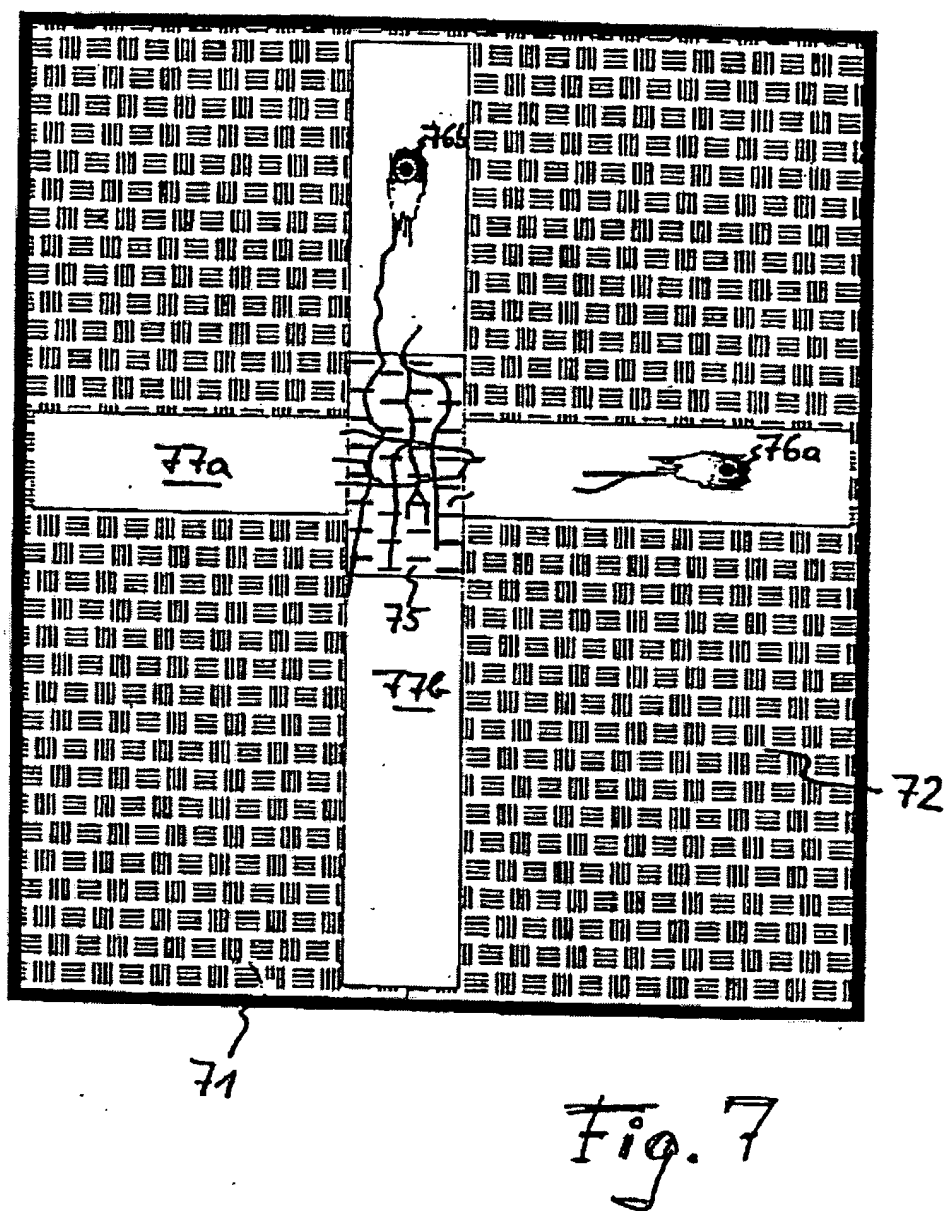


Fig. 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 99/09781

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 601N33/483 C12N5/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 601N C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 359 527 A (ZETTER BRUCE R) 16 November 1982 (1982-11-16) column 1, line 64 -column 2, line 8	1,2
Y		4,5,13, 17-20
Y	EP 0 347 210 A (BECTON DICKINSON CO) 20 December 1989 (1989-12-20) page 1, line 52 -page 2, line 4	4,5
X	FR 2 743 421 A (AETSRN) 11 July 1997 (1997-07-11) page 2, line 30 -page 3, line 8 claim 1	1,2,7
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with one application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
21 March 2000		28/03/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5018 Patentplan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 ops nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Krametz, E

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. Application No.
PCT/EP 99/09781

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 96 15223 A (UNIV LOUVAIN ;DENEZ JEAN LUC (BE); LHOEST JEAN-BENOIT (BE); DETRAI) 23 May 1996 (1996-05-23) page 3, line 20 -page 7, line 17 figure 1	13, 17-20
A		1